

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Marburg

**Rhythmische Veränderungen des Ribo-
und Desoxyribonucleotidpools
im Verlauf des Zellzyklus von Hefe
(*Saccharomyces cerevisiae*)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

INSA FEHRENDT
aus Delmenhorst

Marburg 1976

Druck: Mauersberger, Marburg

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Marburg

**Rhythmische Veränderungen des Ribo-
und Desoxyribonucleotidpools
im Verlauf des Zellzyklus von Hefe
(*Saccharomyces cerevisiae*)**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

INSA FEHRENDT
aus Delmenhorst

Marburg 1976

Druck: Mauersberger, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 30.1.1976

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen
Referent: Prof. Dr. med. W. Schmid
Correferent: Prof. Dr. med. W. Kunz

Inhaltsverzeichnis

1. Die Bedeutung der ...

- 1.1. ...
- 1.2. ...
- 1.3. ...
- 1.4. ...
- 1.5. ...
- 1.6. ...
- 1.7. ...
- 1.8. ...
- 1.9. ...
- 1.10. ...

In Dankbarkeit meinen Eltern und meiner Tante
 Frau Fried Frahm gewidmet.

2. Die Bedeutung der ...

- 2.1. ...
- 2.2. ...
- 2.3. ...
- 2.4. ...
- 2.5. ...
- 2.6. ...
- 2.7. ...
- 2.8. ...
- 2.9. ...
- 2.10. ...

3. Die Bedeutung der ...

- 3.1. ...
- 3.2. ...
- 3.3. ...

4. Die Bedeutung der ...

- 4.1. ...
- 4.2. ...
- 4.3. ...
- 4.4. ...
- 4.5. ...

5. Die Bedeutung der ...

- 5.1. ...
- 5.2. ...
- 5.3. ...
- 5.4. ...
- 5.5. ...
- 5.6. ...
- 5.7. ...
- 5.8. ...
- 5.9. ...
- 5.10. ...

Gliederung

	Seite
Einleitung	1
1. Material und allgemeine Methoden	4
1.1. Chemikalien	4
1.2. Verwendete Geräte	5
1.3. Hefe	6
1.4. Nährmedium	6
1.5. Hefewachstum	6
1.6. Allgemeine Methoden zur Bestimmung von DNA, RNA und Protein	7
1.7. Trennung mit der PEI-Cellulose-Säule	8
1.8. Radioaktivitätsmessung	9
1.9. Puffer nach Sebastian	9
1.10. Herstellung von 'kleinen' Zellen	9
2. Verhalten von Hefegewicht, DNA, RNA und Protein nach Hemmung mit Cycloheximid	10
2.1. Bestimmung der hemmenden Grenzkonzentration von Cycloheximid	11
2.2. Hemmung der RNA, DNA- und Protein- synthese mit Cycloheximid	13
2.3. Hemmversuch mit 20 µg/ml Cycloheximid	15
2.3.1. Proteinbiosynthese bei Hemmung mit CHI	15
2.3.2. RNA-Synthese bei Hemmung mit CHI	15
2.3.3. DNA-Synthese bei Hemmung mit CHI	18
3. Versuche zur Isolierung der DNA-Polymerase	21
3.1. Versuchsdurchführung	21
3.2. Herstellung der DEAE-Cellulose-Säule	21
3.3. Ergebnisse	22
4. Allgemeine Durchführung der Trennung von Desoxyribonucleotiden und Ribonucleotide	26
4.1. Herstellung der löslichen Nucleotide	26
4.2. Die Aminoboronsäuresäule	30
4.2.1. Vorbereiten der Säule	34
4.2.2. Durchführung der Trennung	35
4.3. Aufarbeitung der Eluate der Aminoboron- säuresäule	36
4.3.1. Änderung des Elutionspuffersystems	37
4.3.2. Entfernen von Morpholin durch Aus- schütteln mit organischen Lösungs- mitteln	39
4.3.3. Fällung der Nucleotide mit Aceton	39
4.3.4. Säulenchromatographische Trennung	40

	Seite
4.4. Die PEI-Cellulose-Säule	42
5. Ergebnisse der Trennung von Desoxyribonucleo- tiden und Ribonucleotiden	45
5.1. Verhalten der Gesamtnucleotide bei Kurzzeitmarkierung	46
5.2. Verhalten der Desoxyribonucleotide bei Kurzzeitmarkierung	50
5.3. Der Peak I bei der Auftrennung der Desoxyribonucleotide über die PEI- Cellulose-Säule	56
5.4. Verhalten der Ribosen und Desoxyribosen bei Langzeitmarkierung	58
5.5. Verhalten der Gesamtnucleotide bei Lang- zeitmarkierung	58
5.6. Verhalten der Desoxyribonucleotide bei Langzeitmarkierung	61
Synopsis der Ergebnisse	65
Zusammenfassung	67
Tabellen	68
Literaturverzeichnis	72

Einleitung

Die biologischen Abläufe in einzelligen Eucaryonten, zu denen auch die Sproßhefen wie *Saccharomyces cerevisiae* gehören, haben einen ausgeprägten zyklischen Charakter. Morphologisch ist das individuelle Leben einer Einzelzelle definiert als die Zeit von der Abtrennung einer 'Mutterzelle' (P) bis zu ihrer Durchtrennung in 2 'Tochterzellen' (F_1). Der zeitlich längste Teil eines solchen Zellzyklus wird von der Interphase eingenommen, der Periode zwischen vollendeter Zellteilung und dem Beginn der darauffolgenden Mitose. Die Mitose selbst nimmt nur einen kleinen Teil der Zykluszeit ein, wobei unter ihr hier nur die Kernteilung selbst verstanden sein soll. Kern- und Zellteilung müssen nämlich zeitlich nicht unbedingt zusammenfallen. So schnüren sich die Sprossen der Hefezellen erst eine halbe Zykluszeit nach der Kernteilung ab (WILLIAMSON, 1960).

Nach biochemischen Gesichtspunkten unterteilt man die Interphasen in 3 Unterabschnitte. Im ersten, der G_1 -Phase, werden aus den Nährstoffen des Milieus Zellbestandteile aufgebaut und an ihrem Ende kleinmolekulare Vorstufen für die DNA-Synthese gebildet. Diese selbst nimmt den 2. Abschnitt, die S-Phase ein. Sie läuft innerhalb kurzer Zeit ab und führt zur Reduplikation der DNA und der in ihr enthaltenen Gene. Im 3. Abschnitt, der G_2 -Phase, erfolgt die Umordnung des Zellmaterials als Vorbereitung für die Zellteilung. Bei Änderung der äußeren Bedingungen kann zwar die Zeitdauer der G_1 - und G_2 -Phase variieren, die S-Phase nimmt aber bei den meisten bei sich mitotisch vermehrenden Zellen eine sehr konstante Zeitspanne ein (LARKS, PRESCOTT, SWANN).

Die Erkenntnis eines gesetzmäßig ablaufenden Zellzyklus und der in ihm rhythmisch verlaufenden biochemischen Reaktionen wird heute in der Tumorthherapie zunehmend ausgenützt. Man weiß, daß energiereiche Strahlen und manche Zytostatika nur zu bestimmten Zeiten des Zellzyklus ihre optimale Wirkung entfalten können. So haben alkylierende Substanzen wie 1,3-bis-2-(Chloräthyl)-1-nitrosourea

und Antifolsäuresubstanzen wie Methotrexat, welche die Desoxyuridyl-methyltransferase hemmen, ihre maximale Wirkung nur in der S-Phase, während das Antibiotikum Daunomycin und das Cyclophosphamid ihr Wirkungsmaximum in der G_2 -Phase haben (GERICKE). Im Einzelnen stehen unsere Kenntnisse über Auslösung und Regulation der verschiedenen Zellphasen noch ganz am Anfang. Für die in der G_1 -Phase vor sich gehende Synthese der ribosomalen RNA konnte beim Transcriptionsschritt gezeigt werden, daß die drei Unterfraktionen 26s, 18s und 4s an bestimmten Abschnitten der DNA komplementär gebildet werden und daß diese Segmente nur 2 % des gesamten genetischen Materials ausmachen (FUKUHARA, RETEL and PLANTA, SCHWEIZER). Die molekulare Kontrolle der DNA-Synthese ist noch weitgehend ungeklärt (MOUNOLOU). Für sie hat de KLOD (1966) ein Protein verantwortlich gemacht. Er schließt dies aus der Hemmbarkeit der DNA-Reduplikation mit Cycloheximid. Die Isolierung von DNA-Polymerasen durch KORNBERG et al. würde zu dieser Hypothese passen. Allerdings scheinen nach SMITH für den Beginn der DNA-Synthese mehrere Proteine ausschlaggebend zu sein. Demgegenüber wird von einer Reihe von Autoren angenommen, daß die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Desoxynukleotide für die Initiierung der DNA-Synthese den Anstoß gäbe (ECKSTEIN, DIFFUS, BJURSELL, BRAY, MUNCH-PETERSEN, NEUHARD, WOODLAND).

Die eigenen Versuche befassen sich mit der Einleitung der S-Phase und sind an Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) angestellt worden. Eine solche Untersuchung kann nur an Zellen durchgeführt werden, die sich in möglichst gleichem Entwicklungszustand befinden. Durch fraktionierte Zentrifugation war es SCHMID et al. gelungen, aus einer Mischpopulation 'kleine Zellen' zu gewinnen und sie durch Zusatz der Vitamine B_1 , B_6 und Biotin nach einem Stadium des Wachstums gleichmäßig zur Vermehrung zu bringen. Der Synchronisationsgrad einer solchen Population erwies sich als sehr hoch (WORTBERG, HAERTEL, LANGBEHN).

Von den beiden oben angedeuteten Hypothesen ausgehend, wurden Hemmbarkeit und Hemmungszeitpunkt der S-Phase durch Cycloheximid untersucht, um 1. Kurzzeitenzyme zu erfassen, 2. das Verhalten

von DNA-Polymerasen zu prüfen. Weiterhin wurden 3. die qualitativen und quantitativen Veränderungen der im säurelöslichen Zellextrakt vorliegenden Nucleotide nach der Methode von PFLÜGER verfolgt. 4. Für die Suche nach einer für die Einleitung der S-Phase charakteristischen Konstellation der im Säurelöslichen ebenfalls vorhandenen Desoxyribonucleotide mußte zunächst ein für die Hefe geeignetes Trennungsverfahren der Desoxyribonucleotide und Ribonucleotide ausgearbeitet werden. Erst nachdem dieses zur Verfügung stand, konnte unter Verwendung von ^{14}C -Inosin der Pool der d-Purinnucleotide untersucht werden. Leider verbietet sich bei Hefe für die d-Pyrimidinnucleotide ein entsprechendes Vorgehen unter Einsatz von markiertem Thymin, da weder dieses noch Thymidin in ausreichendem Umfang in die Zelle permeieren.

Material und allgemeine Methoden:

1.1. Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen:

MnSO ₄	Glukose DAB 7
NH ₄ Cl	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
(NH ₄) ₂ SO ₄	Citronensäure
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	Na ₂ HPO ₄
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	KCl
Orcin	Diphenylamin
Mercaptoaethanol	Dioxan reinst
Äthylenglykol	PEI Cellulose
Naphthalin für Scintillationsmessung	
2,5 Diphenyloxazol (= PPO)	
2,2' p-Phenylen-bis-(5-Phenyloxazol) (= POPOP) für Scintillationsmessung	
Morpholin	
Morpholinäthansulfonsäure (MES)	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan p.a.	
EDTA = Titriplex ^(R) III = Äthylendiamintetraessigsäure- Dinatrium-Salz	
Glycerin	
3 Aminobenzolboronsäure gebunden an succinylierte Amino- dodecylcellulose für die Affinitäts-Chromatographie.	

Die Firma Boehringer, Mannheim, lieferte:

Kreatinphosphat
Kreatinphosphatkinase
sowie alle verwendeten Basen, Nucleoside und Nucleotide.

Die verwendeten radioaktiv markierten Chemikalien bezogen wir vom Radiochemical Center, Amersham, England, über Fa. Buchler, Braunschweig:

6 ³H Uracil

Thymidine T (G)

3730 mCi/mmol

(8-¹⁴C) Inosin: spez. Aktivität 60 mCi/mmol

(U-¹⁴C) Inosin: spez. Aktivität 520 mCi/mmol

Fa. Sartorius - Membranfilter GmbH, Göttingen:

Membranfilter: 3,0 µ; Durchmesser 40 mm

Membranfilter: 0,45 µ; Durchmesser 40 mm

Fa. Hormuth-Vetter, Wiesloch:

Whatman DEAE-Cellulose DE 32

Fa. Schleicher & Schüll:

Filterpapier 2043 b

1.2. Verwendete Geräte:

Wasserbad Typ 3047	(Fa. J. Köttermann KG)
pH Meter Typ 100 und Typ 350	(Fa. Knick)
Exzenterzelmühle Typ V1	(Fa. Bühler, Tübingen)
Mikropumpen DBGM Nr. 1824962	(Fa. Bühler, Tübingen)
Christzentrifuge Typ UJ 1S und Typ UJ 3	(Fa. Christ, Osterode/Harz)
Stockzentrifuge Nr. 3019	(Fa. Stock, Marburg)
Gefriertrocknungsanlage	(Fa. F. Kniese, Marburg)
Rührwerk Typ E 60	(Fa. Heidolph Elektro KG)
Spektralphotometer PMQ II	(Fa. Zeiss, Oberkochen/Württ.)
LKB Uvicord Typ 4701 A	(Fa. LKB Produkter AB, Stockholm)
LKB 7000 A Ultra-Rac	(Fa. LKB Produkter AB, Stockholm)
Flüssigkeitsszintillations- zähler Mark I	(Fa. Nuclear, Chicago)
Eppendorf-Photometer 1100 M	(Fa. Netheler & Hinz GmbH, Hamburg)

1.3. Hefe

Für alle hier beschriebenen Versuche wurde käufliche Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*, diploider Stamm) der Fa. Moormann, Herne/Westf., verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Hefe möglichst rasch nach der Zulieferung in Marburg verarbeitet wurde.

1.4. Nährmedium

Die Hefe wächst in dem synthetischen Nährmedium nach WILLIAMSON (1960), modifiziert nach LANGBEHN (1972) mit folgender Zusammensetzung:

Glukose	34,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,98 g
KCl	0,74 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,51 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,35 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	13,6 g
Zitronensäure	5,04 g

ad 1000,0 ml Aqua demin.

Dieser Nährlösung wird, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, in der 0. Min folgendes Vitamingemisch zugefügt:

2,0 ml Biotinlösung (10^{-4} mg %)

2,0 ml B₁-Lösung (10^{-3} mg %)

2,0 ml B₆-Lösung (10^{-3} mg %)

1.5. Hefewachstum

Die zu Beginn des Versuches ungefähr 0,1 %ige Hefesuspension wächst in einem 1 l Rundkolben im Wasserbad bei 30° C. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Lösung wird durch eine Bühler-Pumpe, die mit Hilfe einer 10 ml Meß-Pipette Luft auf den Grund des Gefäßes bläst, gewährleistet. Gleichzeitig wird die Suspension durch einen Magnetrührer ständig bewegt.

1.6. Allgemeine Methoden zur Bestimmung von DNA, RNA und Protein

Die Hefe wächst nach dem oben angegebenen Schema. Jeweils 50 ml der Hefesuspension werden zu den angegebenen Zeitpunkten abgesaugt, mit dem Spatel vom Filter abgekratzt, gewogen und sofort tiefgefroren.

Zum Zellaufschluß werden die Hefezellen noch in der Tiefkühltruhe mit dem Spatel vom Rand der Reagensgläser in diese gestoßen. Man versetzt mit 5 ml kalter 6 %iger Perchlorsäure, rührt 30 Min. und zentrifugiert in der Stockzentrifuge für 5 Minuten bei 1700 x g. Die im Überstand befindlichen löslichen Nucleotide werden bei diesen Versuchen nicht bestimmt und verworfen. Das Sediment wird zum Entfetten 10 Minuten mit 5 ml Äther-Alkohol-Gemisch (1 : 3) gerührt, die Zellen werden erneut abzentrifugiert (Stockzentrifuge 1700 x g), der Niederschlag mit 4 ml 6 %iger Perchlorsäure versetzt, 15 Minuten bei 100° C hydrolysiert und im Eisbad abgekühlt. Nach Zentrifugation befinden sich im Überstand die Spaltprodukte von RNA und DNA, die nach den Methoden von MEJBAUM und BURTON quantitativ bestimmt werden.

Zur Proteinbestimmung wird der Hydrolyse-Rückstand mit 5 ml 0,1 n NaOH 30 Minuten gerührt, und die Suspension wird dann nach BIURET aufgearbeitet.

Diphenylamin Reagens nach DISCHE modifiziert von BURTON

Eisessig	200 ml
H ₂ SO ₄ konz.	3 ml
Diphenylamin	3 g
Acetaldehyd	16 mg

Das Reagens wird stets frisch bereitet.

Ansatz: 0,5 ml Hydrolysat + 1 ml Burton Reagens

Leerwert: 0,5 ml 6 %ige HClO₄ + 1 ml Burton Reagens

Standard: 0,1 ml 0,01 %ige Lachsspermalösung in 6 %iger HClO₄
15 Min. hydrolysiert + 0,4 ml 6 %ige HClO₄ + 1 ml
Burton Reagens.

Reaktionszeit: 14 - 20 Stunden im Trockenschrank bei 30° C.

Messen: 578 nm, 1 cm Küvette.

Orcin-Reagens nach MEJBAUM

Lsg. A: 12 n HCl	100 ml
6 %ige alkoholische Orcinlösung	3,5 ml
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	100 mg

Das Reagens wird vor dem Versuch frisch bereitet und wie folgt verdünnt:

Lsg. B: 20 ml Lösung A + 9 ml 6 %ige HClO_4

Ansatz: 0,1 ml Hydrolysat + 2,9 ml Lösung B

Leerwert: 0,1 ml HClO_4 + 2,9 ml Lösung B

Reaktionszeit: 20 Min. bei 80°C erhitzen, abkühlen im
Eiswasser.

Messen: 660 nm.

Proteinbestimmung nach WEICHSELBAUM modifiziert von BIURET

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	4,7 g
Kaliumnatriumtetrat	9,0 g
NaOH	8,0 g
KJ	5,0 g

ad 1000 ml Aqua bidest.

Ansatz: 1,0 ml Suspension + 2 ml Biuretreagens

Leerwert: 1 ml 0,1 n NaOH + 2 ml Biuretreagens

Reaktionszeit: 30 Min. bei Zimmertemperatur.

Messen: 546 nm.

1.7. Trennung mit der PEI-Cellulose-Säule

Die Arbeiten mit der PEI-Cellulose-Säule richteten sich genau nach den Angaben von K.H. PFLÜGER. Alle Trennungen wurden mit Säule B und Gradient Nr. 4 durchgeführt. Im Teil 4 ist ein kurzer Versuch der Trennung der Gesamtnukleotide eines sauren Hefezell-extraktes beschrieben. Die quantitative Auswertung der einzelnen Nukleotide erfolgte gravimetrisch. Hierzu wurden die Extinktionskurven fotokopiert, die einzelnen Peaks ausgeschnitten und auf der Analysenwaage gewogen.

Bei den Trennungen der radioaktiv markierten Nukleotide im Teil 4 wurde das Säuleneluat mit dem LKB 7000 A Ultra-Rac-Fraktionssammler gesammelt. Fraktionslänge: 10 Min., Flüssigkeitsmenge 2,6 ml. Zur radiochemischen Messung wurden 1 ml Eluat in 10 ml Bray-Lösung pipettiert. Da die extrahierten Desoxynukleotidmengen optisch nicht zu erfassen sind, wurde bei diesen Versuchen je 200 μ g AMP, ADP und ATP als Marker zugesetzt.

1.8. Radioaktivitätsmessung

Die Messung der radioaktiv markierten Substanzen erfolgte im Flüssigkeitsscintillationszähler Mark I (Fa. Nuclear Chicago). 1,00 ml der zu messenden Flüssigkeiten wird mit 10 ml Scintillatorflüssigkeit nach BRAY im Kunststoff-Fläschchen vermischt und 4 Min. gezählt. Für die Auswertung werden jeweils die cpm-Werte herangezogen.

Bei den Radioaktivitätsmessungen im Teil 3 werden die Filterpapierplättchen bzw. Filter in die Scintillationsflüssigkeit eingetaucht; die Flüssigkeitsmenge beträgt hier 15 ml.

1.9. Puffer nach SEBASTIAN zur DNA-Polymerase-Isolierung

Tris(hydroxymethyl)aminomethane(Tris)-hydrochloride	50 mM
MgCl ₂	2 mM
Mercaptoäthanol	1 mM
EDTA	0,2 mM
Glycerin	20 %

1.10. Herstellung von kleinen Zellen

Die Synchronisation der Hefezellen wurde durch Auswahl gleich großer Zellen durch wiederholtes Zentrifugieren in isotoner Kochsalzlösung nach SCHMID et al. (vgl. STOSSEK und LANGBEHN) in der Modifikation von BRAUN vorgenommen.

2. Verhalten von Hefegewicht, DNA, RNA und Protein nach Hemmung mit Cykloheximid

Die wachstumshemmende Wirkung von Cykloheximid = CHI (in der Literatur auch als Actidion bezeichnet) ist schon lange Zeit bekannt. Das von *Streptomyces griseus* produzierte Antibiotikum wurde 1946 von WHIFFEN et al. isoliert, und die Hemmwirkung auf verschiedene Hefearten wurde seither von vielen Forschergruppen untersucht (KERRIDGE, 1958, LATUASAN and BERENDS, 1958, TSUKULA et al., 1962, WESCOTT, 1962 u.s.w.).

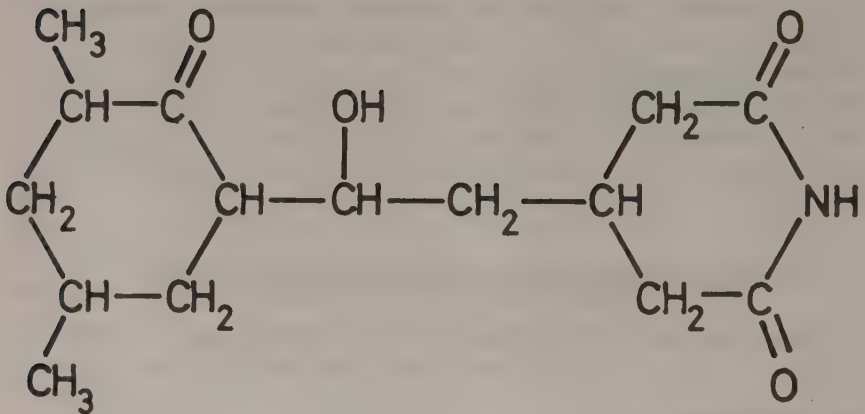


Abb. 1: Formel von Cykloheximid

SIEGEL et al. konnten dann zu Beginn der 60-er Jahre den genauen Wirkungsmechanismus des Cykloheximids an verschiedenen Hefearten aufklären (SIEGEL et al., 1963, 1964 BBA Nr. 87 S. 70, 1964 BBA Nr. 87 S. 83, 1964 BBA 103). Cykloheximid greift in die Proteinsynthese ein. Die Hemmung erfolgt bei der Übertragung der aktivierten Aminosäure an die nascierende Proteinkette. Nach Wettstein (1965) sollen die Ribosomen so verformt werden, daß sie frühzeitig von der mRNA abfallen oder daß die mRNA durch das Cykloheximid zerstört wird.

Zu beachten ist, daß Cykloheximid nur die zytoplasmatische Proteinsynthese hemmt, sowohl mitochondriale als auch die bakterielle werden nicht oder nur sehr geringfügig beeinflusst.

2.1. Bestimmung der hemmenden Grenzkonzentration von Cykloheximid

Die verschiedenen Autoren setzen bei ihren Hemmversuchen mit Cykloheximid sehr unterschiedliche Konzentrationen ein. So verwenden GRAY et al. bei *Saccharomyces Carlsbergiensis* 0,02 µg/ml, SIEGEL et al. bei *Saccharomyces fragilis* 6,25 µg/ml FUKUHAMA bei *Saccharomyces cerevisiae* 25 µg/ml, FOURY 10 µg/ml und STEPHEN sogar 250 µg/ml.

WHIFFEN findet für *Saccharomyces Carlsbergiensis*, daß 0,017 µg/ml die minimale Dosis für den Beginn einer Hemmwirkung ist.

Wir haben nun zunächst in Vorversuchen eine Cykloheximidkonzentration gesucht, die das Wachstum von synchronisierten *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen unter unseren Bedingungen deutlich hemmt. Dazu werden zu einer 0,1 %igen Suspension kleiner Hefezellen in der 60 Min. verschiedene Cykloheximidkonzentrationen und 30 Minuten später Biotin und die Vitamine B₁ und B₆ zugefügt (allgemeiner Versuchsverlauf s.o. Material und allgemeine Methoden).

Aus der Abbildung 2 wird deutlich, daß die hemmende Wirkung von Cykloheximid mit steigender Konzentration des Hemmstoffes zunimmt. Die von WHIFFEN et al. bestimmte minimale hemmende Dosis von 0,017 µg/ml Cykloheximid ist für *Saccharomyces cerevisiae* kleiner. Hier hemmen auch schon 0,01 µg/ml 5 Stunden nach Zugabe des Hemmstoffes das Wachstum um ungefähr 20 %.

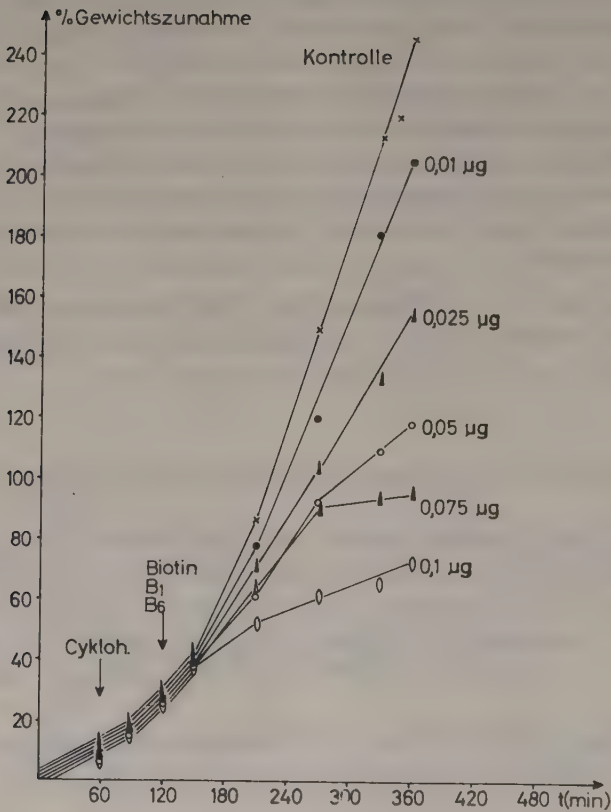


Abb. 2: Prozentuale Gewichtszunahme einer synchronen Hefekultur bei verschiedenen Cycloheximidkonzentrationen.

Bei unseren Versuchen ist auffällig, daß sich die hemmende Wirkung des Cycloheximids noch 90 Min. nach der Zugabe gewichtsmäßig nicht bemerkbar macht. Erst in der 180. Min. wird die Wirkung vor allem bei 0,1 µg/ml deutlich. Mit höheren Cycloheximidkonzentrationen (20 µg/ml) konnte in späteren Versuchen gezeigt werden, daß eine Hemmung der Gewichtszunahme auch schon 20 Min. nach Zugabe des Hemmstoffes eintritt. Von der Konzentration des Wirkstoffes

ist also nicht nur die Wirkungshöhe sondern auch der Wirkungseintritt abhängig. Ein totaler Wachstumsstillstand ist unter unseren Bedingungen mit $0,1 \mu\text{g/ml}$ Cykloheximid auch 300 Min. nach Zugabe nicht zu erreichen.

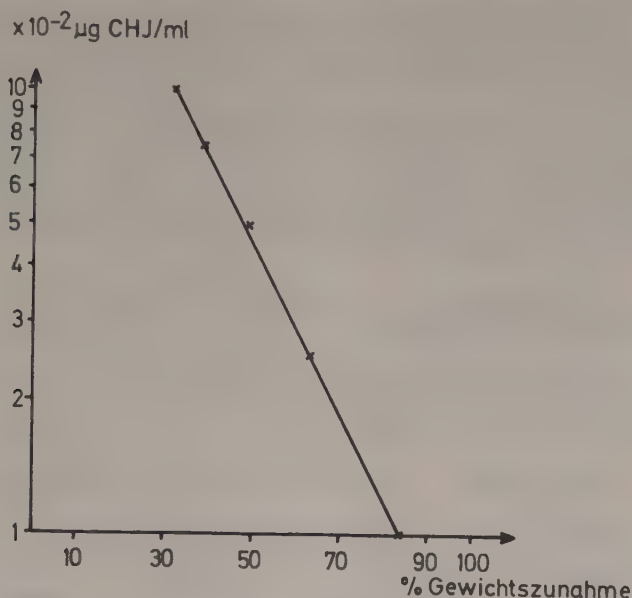


Abb. 3: Gewichtszunahme einer synchronen Hefepopulation 300 Min. nach Zugabe der verschiedenen Cykloheximidkonzentrationen. Kontrolle = 100 % (Halblogarithmische Darstellung)

Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß die Wachstumshemmung einer synchronen Hefekultur von der logarithmischen Konzentration von Cykloheximid abhängig ist. Zu beachten ist noch, daß bis zur 150 Min., also dem Zeitpunkt, an dem die Hemmwirkung gewichtsmäßig erfaßbar wird, schon 17 % der Gesamtgewichtszunahme bis zur 360. Min erreicht worden sind.

2.2. Hemmung der RNA-, DNA- und Proteinsynthese mit Cykloheximid

Bei den oben beschriebenen Vorversuchen wurde die Beobachtung gemacht, daß der Proteinhemmstoff Cykloheximid neben der Proteinsynthese auch die DNA- und RNA-Synthese hemmt. Diese Beobachtung

ist schon häufig in der Literatur beschrieben worden.

Für die Untersuchungen über das Verhalten von DNA-, RNA- und Proteinsynthese bei Hemmung mit Cykloheximid wurde der Versuchsaufbau wie folgt geändert:

1. Die Cykloheximidkonzentration wird auf $20 \mu\text{g/ml}$ erhöht, um möglichst eine rasche und vollständige Hemmwirkung zu erreichen. Dabei wird durch Trypanblau-Färbungsversuche sichergestellt, daß diese Cykloheximidkonzentration nicht zum Zelltod führt. Später wurde eine Veröffentlichung von GOLOBECK et al. bekannt, in der Hefekulturen mit $200 \mu\text{g/ml}$ Cykloheximid gehemmt werden. Auch mit $200 \mu\text{g/ml}$ ist die letale Dosis für die Hefe nicht erreicht.
2. Die Vitamine Biotin, B_1 und B_6 werden zu Beginn des Versuches (≈ 0 Min.) zugesetzt.

Das Verhalten von Hefegewicht, DNA, RNA und Protein unter den hier beschriebenen Bedingungen ist in Abbildung 4 aufgezeigt.

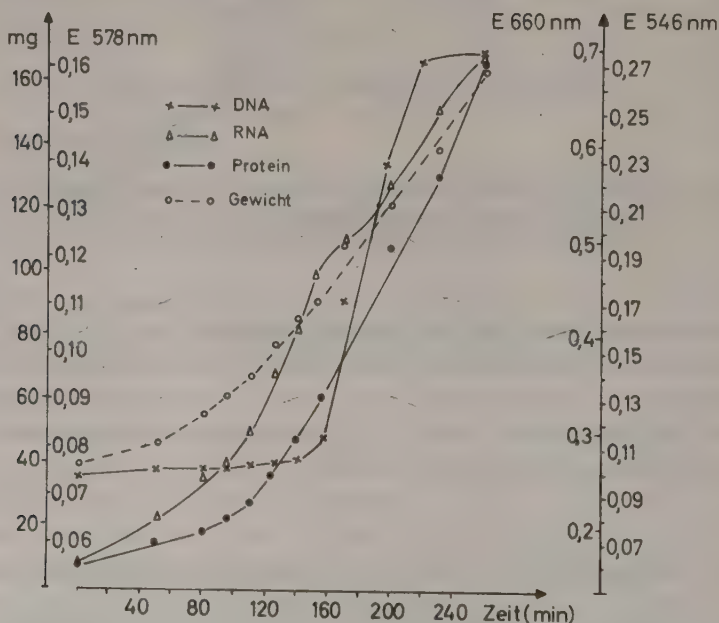


Abb. 4: Verhalten von Hefegewicht, DNA, RNA und Protein im Zellzyklus von *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3. Hemmversuche mit 20 µg/ml Cykloheximid

2.3.1. Proteinbiosynthese bei Hemmung mit CHI

Die Proteinvermehrung einer ungehemmten Hefekultur verläuft nahezu exponentiell im Zellzyklus. Dabei ist zu beachten, daß die einzelnen Proteine dieser mathematischen Funktion nicht gehorchen müssen; daß im Gegenteil die größte Anzahl der Enzyme periodisch gebildet wird (peak-Enzym bzw. step-Enzym).

So folgt von den bei MITCHISON aufgeführten Enzymen von *Saccharomyces cerevisiae*, die auf den zeitlichen Ablauf ihrer Biosynthese untersucht wurden, nicht ein Enzym einer linearen oder exponentiellen Funktion. Außerdem ist noch die unterschiedliche Halbwertszeit der einzelnen Enzyme zu beachten.

Durch 20 µg/ml Cykloheximid wird die Proteinbiosynthese sofort nach Zugabe des Antibiotikums gehemmt (s. Abb. 5 Nr. 4 und Abb. 6 Nr. 4).

2.3.2. RNA-Synthese bei Hemmung mit CHI:

Bei der RNA-Bestimmungsmethode nach MEJBAUM werden alle drei RNA-Arten quantitativ erfaßt. Dabei ist immer zu beachten, daß 80 % der Gesamt-RNA in wachsenden Zellen rRNA ist und der größte Teil der verbleibenden 20 % von tRNA repräsentiert wird, so daß bei Veränderungen des RNA-Gehaltes hauptsächlich Änderungen des rRNA-Gehaltes gemessen werden.

Die RNA-Synthese einer logarithmisch wachsenden Hefekultur verläuft in weiten Teilen des Zellzyklus exponentiell. Zur Zeit der stärksten DNA-Synthese durchläuft die RNA-Synthese ein leichtes Plateau, was auf Abb. 4, Abb. 5 Nr. 3 "Kontrolle" und Abb. 6 Nr. 3 "Kontrolle" zu erkennen ist. Dieses Ergebnis wird von WILLIAMSON (1960) und BRAUN unterstützt, wenn auch andere Autoren (TAURO, 1969) diese Beobachtung nicht gemacht haben.

Nach Zugabe von Cykloheximid läuft die RNA-Synthese noch 20 - 30 Minuten unvermindert weiter, erst dann kommt es zu einer plötzlichen Synthesehemmung.

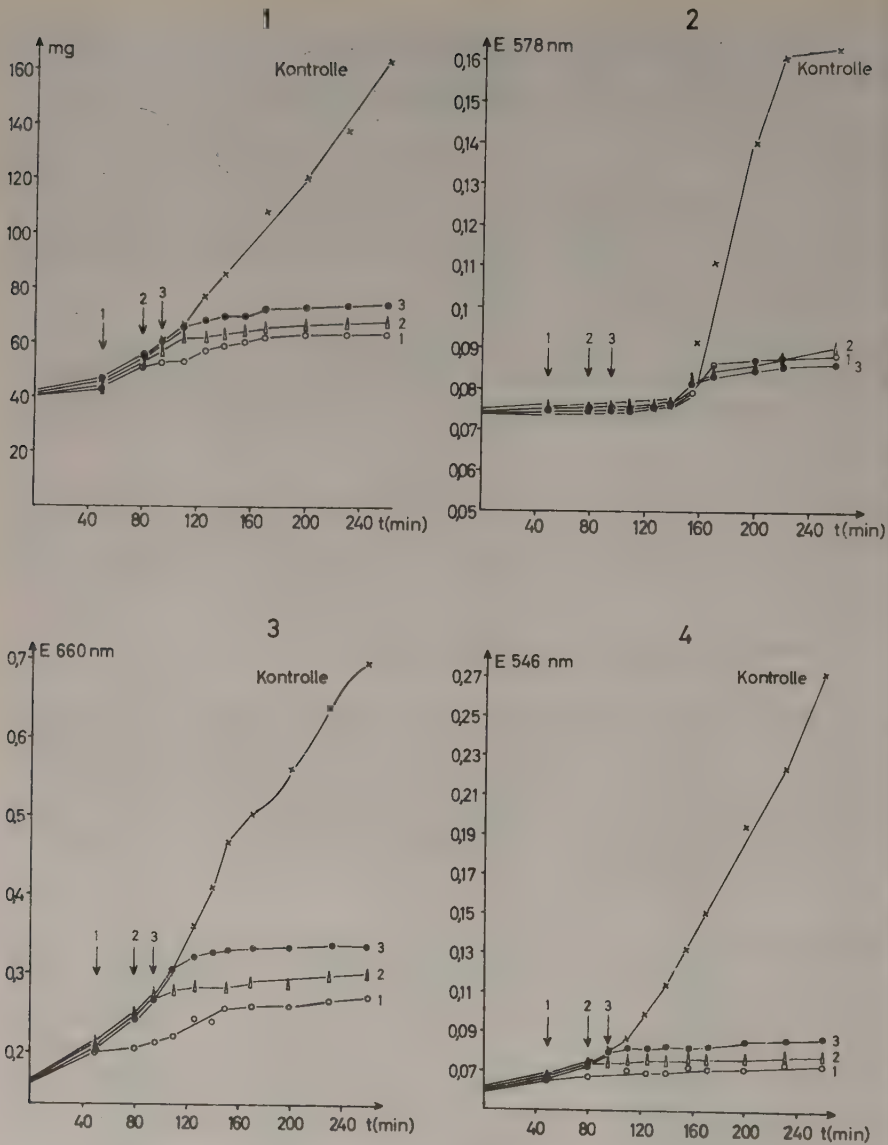


Abb. 5: Hemmung mit 20 ug/ml CHI in der 60. (1), 80. (2) und 115. (3) Minute.
 1 (oben links): Gewicht; 2 (oben rechts): DNA; 3 (unten links): RNA; 4 (unten rechts): Protein

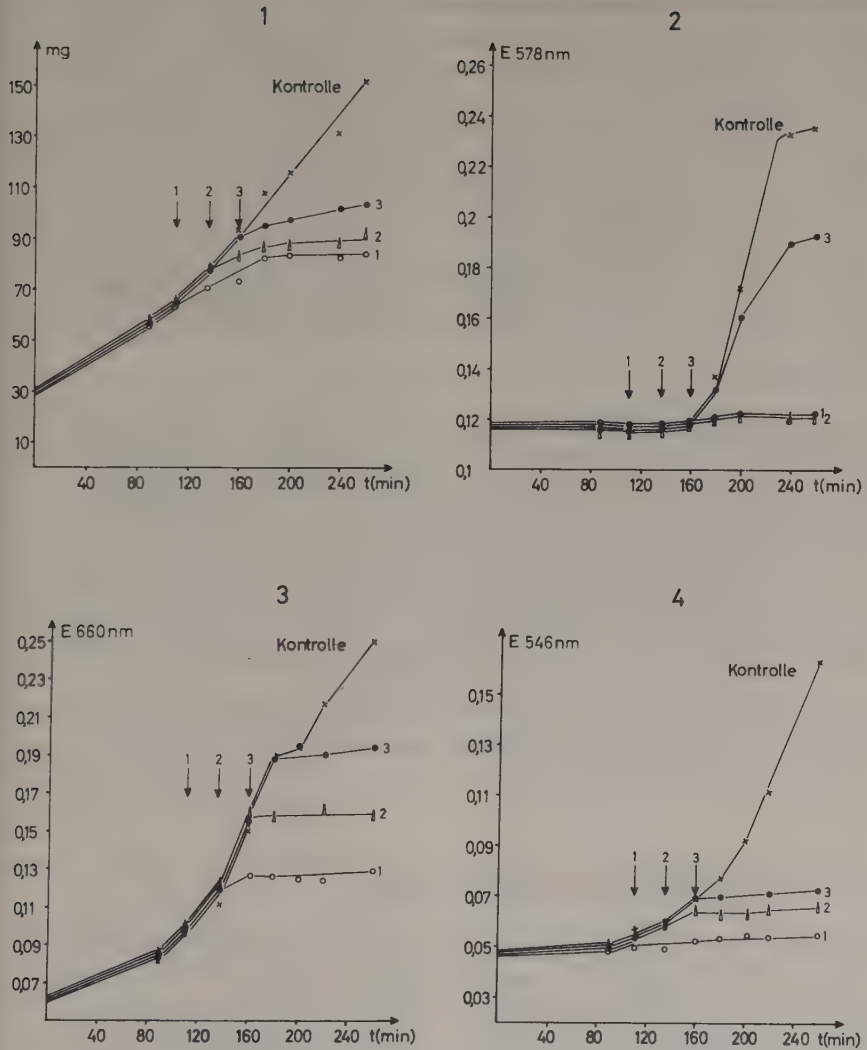


Abb. 6: Hemmung mit 20 ug/ml CHI in der 110. (1), 135. (2) und 160. (3) Minute.
 1 (oben rechts): Gewicht; 2 (oben links): DNA;
 3 (unten rechts): RNA; 4 (unten links): Protein

Bei niedrigen Cykloheximidkonzentrationen wird die RNA-Synthese auch bei totaler Proteinsynthesehemmung bei Hefe nur wenig gehemmt (FUKUHARA, 1965). Bei Versuchen mit markiertem Uracil stellt FUKUHARA weiter fest, daß nach Hemmung mit Cykloheximid (25 µg/ml) vor allem noch die RNA-Fraktion markiert ist, die normalerweise bei einer Kurzzeitmarkierung (2 - 3 Min.) erhalten wird und die sehr schnell in ribosomale und transfer RNA umgewandelt wird. Bei Hemmung mit Cykloheximid bleibt diese Fraktion mehr als 60 Minuten erhalten, die Cykloheximidhemmung führt also zu einem Ausbau der high-turnover RNA. Durch Cykloheximidhemmung wird also der letzte Schritt, der zur fertigen RNA führt, spezifisch gehemmt, was zeigt, daß für die Reifung der RNA eine ständige Proteinbiosynthese nötig ist (UDEM, 1971).

Die entscheidenden Faktoren, die die RNA-Synthese nach Cykloheximidgabe hemmen, wurden von BENECKE an Rattenlebern untersucht. Bisher wurde von vielen Autoren angenommen, daß eine ständige Proteinbiosynthese nötig ist, um den Gehalt an nukleolarer RNA-Polymerase aufrecht zu erhalten (YU et al.). BENECKE zeigte nun, daß auch nach 24-stündiger Cykloheximidbehandlung die Aktivität der Rattenleber-RNA-Polymerase nicht signifikant abnimmt. Hier müssen also andere kurzlebige Enzyme zu einer Hemmung der RNA-Synthese führen.

Aus unseren Versuchen (Abb.5 Nr.3 und Abb.6 Nr.3) ist zu entnehmen, daß die Aktivität dieser Enzyme bei der Hefe auf 20 - 30 Minuten begrenzt stattfindet.

2.3.3. DNA-Synthese bei Hemmung mit CHI

WILLIAMSON (1965) konnte zeigen, daß die DNA-Synthese kurz nach Beginn der Sprossung der Hefezellen beginnt und die S-Phase nicht länger als 1/4 der Generationszeit einnimmt. Dabei muß beachtet werden, daß die Trennung von Mutter- und Tochterzellen erst ungefähr 1/2 Zellzyklus nach der Kernteilung erfolgt. Unter den Wachstumsbedingungen von WILLIAMSON (1966) dauert ein Zellzyklus ungefähr 2 Stunden. Dabei geht WILLIAMSON von einer synchronen Kultur großer Hefezellen aus, während wir mit kleinen Hefezellen beginnen. Genauere Untersuchungen über die Zellzykluslänge unter unseren Bedingungen wurden nicht durchgeführt. Bei unseren Versuchen ist die

außergewöhnliche Länge des 1. Zellteilungszyklus (0. bis ungefähr 220. Min.) auch dadurch bedingt, daß die Hefezellen zur Synchronisation direkt aus einem käuflichen Hefeblock entnommen wurden und durch Transport und Lagerung ausgehungert sind.

Die DNA-Synthese unter normalen Wachstumsbedingungen ist in Abbildung 4 gezeigt. Danach beginnt bei einer synchron wachsenden Kultur kleiner Hefezellen die DNA-Synthesephase ungefähr zur 160. Minute, wenn Biotin, B_1 und B_6 zu Beginn zugegeben worden sind. Die DNA-Synthesephase erstreckt sich über 50 Minuten und erreicht nach ungefähr Verdopplung der DNA-Menge ein Plateau, um in der S-Phase des nächsten Zellteilungszyklus erneut steil anzusteigen.

Nach der Hemmung mit Cykloheximid macht man bei der DNA-Vermehrung folgende interessante Beobachtungen. Fügt man den Hemmstoff in der 60., 80. oder 115. Minute zu, so ist eine leichte DNA-Zunahme in der 240. Minute bei allen 3 Proben meßbar ($\sim 6,5\%$) (Abb. 5 Nr. 2). Da diese DNA-Zunahme bei allen 3 Versuchen auftritt, ist ein Meßfehler wohl auszuschließen. Es wurde schon oben erwähnt, daß Cykloheximid die DNA-Synthese der Mitochondrien nicht beeinflußt. Der Anteil der mitochondrialen DNA an der Gesamt-DNA beträgt ungefähr 5 % (MOUNOLOU). In Abb. 5 Nr. 2 sieht es so aus, als ob der DNA-Anstieg in den mit Cykloheximid gehemmten Proben gleichzeitig mit dem Anstieg in der Kontrolle, also gleichzeitig mit dem Synthesebeginn der nukleolaren DNA erfolgt. WILLIAMSON (1969) nimmt aber an, daß die DNA-Synthese in den Mitochondrien kontinuierlich im Verlauf des Zellzyklus erfolgt.

Bei Cykloheximidzugabe 50 bzw. 25 Minuten vor Beginn der S-Phase wird ebenfalls keine nukleolare DNA synthetisiert, während bei Gabe des Hemmstoffes zu Beginn der S-Phase (160. Min.) 82 % DNA in der gehemmten Probe im Vergleich zur Kontrolle gebildet werden (Abb. 6 Nr. 2). Dieser Versuch zeigt, daß zu Beginn der S-Phase alle für die Vermehrung der DNA nötigen Enzyme gebildet sind, daß diese Enzyme andererseits aber erst kurz vor der S-Phase synthetisiert werden. Spätere Versuche zeigten, daß die DNA-Bildung bei Hemmung in der 145. Minute noch vollständig unterdrückt werden kann, die Synthese der für die DNA-Reduplikation notwendigen Enzyme muß also in den 15 Minuten vor Beginn der S-Phase ablaufen. -

WILLIAMSON (1973) gibt diese Zeitspanne mit 10 Minuten an. - Es handelt sich hier also um typische Peak-Enzyme (s.a. MITCHISON).

Außerdem zeigt sich, daß die Hefe-DNA-Reduplikation durch 1 "replicative unite" (WILLIAMSON, 1973) erfolgt und nicht wie bei dem Myxomyceten *Physarum polycephallum*, bei dem die DNA-Reduplication in verschiedene Untereinheiten aufgeteilt ist, die jede für sich durch Cykloheximid gehemmt werden kann (MULDOON).

Eine quantitative DNA-Synthese der gehemmten Probe im Vergleich zur Kontrolle bei Zugabe von Cykloheximid in der 160. Minute wird unter unseren Bedingungen nicht erreicht. Die nur 82 %ige DNA-Reduplikation ist wohl auf die unvollständige Synchronie der Kultur zurückzuführen. Ein Teil der Zellen hat zu dem Zeitpunkt die für die DNA-Synthese nötigen Enzyme noch nicht vollständig gebildet und kann nach Zugabe von Cykloheximid die Synthese auch nicht mehr beenden, so daß ihnen eine DNA-Reduplikation nicht möglich ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Wirkung von Cykloheximid auf die Protein-DNA- und RNA-Neosynthese recht unterschiedlich ist. Wird die Proteinbildung sofort nach Zugabe des Hemmstoffes unterbrochen, so wird die RNA-Synthese noch 20 - 30 Minuten fortgeführt, während die DNA-Reduplikation je nach Zeitpunkt der Zugabe des Hemmstoffes im Verlauf des Zellteilungszyklus entweder vollständig unterdrückt wird oder ungehindert fortläuft.

3. Versuche zur Isolierung der DNA-Polymerase

Um genauere Aussagen über die hemmende Wirkung von Cykloheximid auf die DNA-Synthese machen zu können, wurde versucht, die DNA-Polymerase aus synchronisierten Hefezellen zu isolieren. Gestützt auf Isolierungsversuche der RNA-Polymerase bei *E. coli* (MIERAU, 1973) wird die Hefe wie folgt aufgearbeitet:

3.1. Versuchsdurchführung:

5 g synchronisierte Hefe wachsen 3 Std. im synthetischen Medium nach WILLIAMSON unter Zugabe von Biotin und den Vitaminen B₁ und B₆ (s.a. Material und allg. Methoden). Die Hefe wird abgesaugt, in 2 ml Puffer nach SEBASTIAN (s.a. Material und allg. Methoden) suspendiert und in einer Bühler-Zellmühle mit Glasperlen zerschlagen. Die Glasperlen werden auf einer Glasfritte G 3 abgesaugt, 2 mal mit 5 ml Puffer gewaschen und das Filtrat wird durch Zentrifugation (10 Min. bei 15000 g) von groben Zellkompartimenten gereinigt. Die Flüssigkeit wird auf eine DEAE 32 Cellulose-Säule (40 cm x 2 cm) aufgetragen und die Polymerase mit einem linearen Ammoniumsulfatgradienten 0,0 m (NH₄)₂SO₄ - 0,5 m (NH₄)₂SO₄ ausgewaschen. Alle Vorgänge finden bei 4°C statt.

3.2. Herstellen der DEAE-Cellulose-Säule:

Das Säulenmaterial (Fa. Whatman) wird zunächst mit 0,2 n HCl und 0,2 n NaOH precyclet und anschließend mit Wasser so lange gespült, bis der pH-Wert zwischen pH 6 und pH 7 liegt. Das Chromatographierohr (40 cm x 2 cm) wird etwa 0,5 cm hoch mit Glaswolle gestopft, und die in der Glaswolle befindlichen Luftblasen werden entfernt. Mit Hilfe eines Einfüllstutzens wird das Säulenmaterial vorsichtig bis ungefähr 3 cm unterhalb des Glasschliffandes in die Säule gegossen. Das Säulenmaterial wird durch schwachen Luftdruck leicht zusammengepreßt. Der Flow beträgt 1/2 ml/Min.

Der Zellextrakt wird auf die Säule aufgetragen und nach dem Einsickern der lineare Ammoniumsulfatgradient angeschlossen.

Man erhält bei Registrierung mit einer Zeiss Meßeinheit bei 280 nm bei 0,15 m (NH₄)₂SO₄ und 0,2 m (NH₄)₂SO₄ einen peak. Die Fraktionen werden gesammelt und wie folgt auf DNA-Polymerase-Aktivität getestet:

Standardlösung:	dAMP	0,918 mg
	dCMP	0,9 mg
	dGMP	0,918 mg
	ATP	18,2 mg
	Tris-HCl	19,36 mg
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,1015 g
	Mercaptoäthanol	0,2 mg
	³ H-Thymidin	

lösen in 18 ml Puffer pH 8

Lösung 2: Zu 2,5 ml Standardlösung vor dem Versuch zufügen:

Kreatinphosphat	4,2 mg
Kreatinphosphat-kinase	300 µg

Testgemisch: 100 µl Lösung 2
100 µl Kalbsthymus DNA-Lösung (0,4 mg DNA/ml)
100 µl Säuleneluat

Als Kontrolle werden statt der 100 µl Säuleneluat 100 µl Puffer zugesetzt.

Das Testgemisch reagiert 30 Minuten bei 37° C unter Schütteln in Mikrogefäßen der Fa. Eppendorf. Anschließend werden 200 µl des Testgemisches auf 16 cm² große Papierfelder (Fa. Schleicher & Schüll) aufgetropft. Sobald die Flüssigkeit eingezogen ist, wird das Filterpapier in eiskalte 4 %ige HClO₄ geworfen, 30 Minuten dort belassen und zweimal mit eiskalter 5 %iger HClO₄, danach mit Äthanol/Äther (1:1, v/v) und schließlich mit Äther gespült. Nach dem Trocknen werden die Papierplättchen in Scintillatorfläschchen mit 15 ml Scintillationsflüssigkeit nach BRAY überführt und die Radioaktivität nach Adaption im Mark I der Firma Nuclear Chicago, gemessen.

3.3. Ergebnisse

Mit dieser Versuchsanordnung können zwei Ergebnisse gezeigt werden:

1. Cykloheximid beeinflusst die Aktivität der gebildeten DNA Polymerase in vitro nicht.

Hierzu wird zu dem Testansatz 3,3 µg Cykloheximid zugefügt. Die Aktivität der DNA-Polymerase wird gegenüber einer Kontrolle ohne Cykloheximid nicht beeinträchtigt.

Dieses ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die Hemmung durch Cykloheximid auf der fehlenden Proteinsynthese beruht, und daß nicht etwa irgendwelche sterischen oder konformationsändernden Effekte des Cykloheximids am Enzymmolekül für die Wirkung mitverantwortlich sind (s.a. Teil 2).

2. Wird Cykloheximid vor der 145. Min. des Zellteilungszyklus einer logarithmisch wachsenden Hefekultur zugefügt und wird diese 35 Minuten später geerntet und nach oben beschriebener Methode aufgearbeitet, so ist die Aktivität der DNA-Polymerase in der gehemmten Probe niedriger als in der Kontrolle

	Kontrolle ohne Hemmstoff	Cykloheximid vor der 145. Min.
Versuch I	342 %	141 %
Versuch II	870 %	690 %
Versuch III	540 %	210 %

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Gesamtaktivität bei der ungehemmten Probe im Mittel 584 % über dem Blindwert (statt Polymerase wird dem Testgemisch Puffer zugefügt) liegt, während der prozentuale Mittelwert bei der gehemmten Probe 347 % beträgt. Quantitative Aussagen lassen sich aus diesen Versuchen nicht entnehmen, da die Streuung zu groß ist, was auf verschiedene Mängel der Versuchsdurchführung zurückzuführen ist.

1. Auf Grund der Synchronisationsmethode ist es uns nicht möglich, mehr als ungefähr 5 g Hefe für einen Versuch zu synchronisieren. Es ist fraglich, ob diese Hefemenge überhaupt ausreicht, genügend Mengen der DNA-Polymerase zu isolieren. Nach Beendigung unserer Versuche wurde mir eine Arbeit bekannt, in der U. WINTERSBERGER die Aktivität der Hefe-DNA-Polymerase bestimmt. Zur Isolation werden 200 g synchron wachsende Hefe herangezogen.

2. Es ist fraglich, ob das im Testgemisch aus finanziellen Gründen eingesetzte ^3H -Thymidin und die Desoxyribosemonophosphate schnell genug und quantitativ zu den Triphosphaten durch Kreatinkinase umgewandelt werden. (Die Zusammensetzung des Testgemisches wurde in abgeänderter Form von WEITZEL übernommen). WINTERSBERGER (1969a) setzt für ihre Testversuche nur Triphosphate ein und bezweifelt die Effektivität des Kreatinphosphat/Kreatinkinase-Systems (schriftl. Mitteilung E. WINTERSBERGER).

3. Die von KORNBERG beschriebene DNA-Polymerase I (RICHARDSON) ist wahrscheinlich lediglich für repair-Funktionen verantwortlich. Hierfür sprechen vor allem 3 Tatsachen:

- a) Die Wechselzahl der Polymerase in vitro ist wesentlich geringer als es die Syntheserate von DNA in vivo verlangt (SMITH).
- b) Eine semikonservative Synthese wird in vitro bei einer doppelsträngigen DNA als Matrize nicht erreicht (SMITH).
- c) de LUCIA et al. konnten einen E. coli Stamm isolieren, der eine normale Vermehrung zeigt, dessen Kornberg-Polymerase-Aktivität aber nur 1 % des Wildtyps beträgt.

SMITH und KNIPPERS finden nun bei E. coli eine membrangebundene DNA-Polymerase, deren in vitro-Eigenschaften sehr gut mit den Beobachtungen in vivo übereinstimmen.

Wir beobachteten bei unseren Versuchen, daß das Pellet, das bei der Abzentrifugation der großen Zellbestandteile erhalten wird, eine verhältnismäßig hohe Aktivität zeigt. Daher nehmen wir bei der Hefe ähnliche Verhältnisse an, wie von SMITH bei E. coli geschildert. Um die membrangebundene Polymerase abzulösen, werden die in der Zelmühle aufgebrochenen Hefezellen 1/4 Stunde mit 0,5 M KCl gerührt, anschließend wird das KCl durch Dialyse wieder entfernt, ohne vorher das leicht sedimentierbare Material abzuzentrifugieren. SEBASTIAN erzielt durch die Behandlung mit KCl bei der Isolierung der RNA-Polymerase aus Hefe eine Steigerung der Ausbeute um mehr als 300 %. In unseren Versuchen werden für die DNA-Polymerase keine wesentlich besseren Ergebnisse erhalten. Die Dissoziation der DNA-Polymerase von den Membranpartikeln ist weitgehend reversibel (schriftl. Mitteilung von E. WINTERSBERGER),

so daß der größte Teil der Polymerase wieder an die Membranpartikel reassoziert, wenn diese nicht vor der Dialyse abzentrifugiert werden.

Auf Grund der oben angeführten Überlegungen ist es wahrscheinlich, daß bei allen hier beschriebenen Versuchen vornehmlich das Kornbergenzym und nicht die DNA-Polymerase isoliert worden ist. So wären auch mit der geringen Enzymkonzentration die niedrigen Einbauraten zu erklären. Da die Kornberg-Polymerase als repair-Enzym ständig in der Zelle präsent sein muß, wird es sich hier nicht um ein peak-Enzym handeln (genaue Untersuchungen sind mir nicht bekannt), so daß es auch nicht kurz vor der DNA-Reduplikation gebildet wird. Dieses wäre eine Erklärung dafür, daß die Polymeraseaktivität mit Cykloheximid bei Zugabe in der 145. Minute nicht vollständig hemmbar ist, da ja nur die Neubildung des Kornberg-Enzyms durch Cykloheximid unterdrückt wird, während schon gebildetes Enzym in seiner Aktivität nicht beeinflußt wird. Hier erhebt sich sofort die Frage nach der Halbwertszeit des Enzyms. Untersuchungen darüber liegen mir nicht vor, es ist aber denkbar, daß die Halbwertszeit mehr als 35 Minuten beträgt.

Diese Überlegungen lassen sich durch unsere Versuchsergebnisse nur lückenhaft belegen. Ausführliche Versuche zur Isolierung der DNA-Polymerase und des Kornbergenzym sind nötig, um diesen Problemkomplex abzuklären.

4. Allgemeine Durchführung der Trennung von Desoxyribonucleotiden und Ribonucleotiden

4.1. Herstellung der löslichen Nucleotide

Die synchronisierte Hefe wächst - wie schon unter Material und allgemeine Methoden beschrieben - im Nährmedium nach WILLIAMSON bei 30° C und wird wie folgt geerntet und aufgearbeitet:

Versuch A: 8 Minuten vor dem in den Kurven angegebenen Zeitpunkten werden 100 ml Hefesuspension kurz in der Stockzentrifuge bei 10.000 U ($\hat{=}$ 1700 x g) zentrifugiert, der Überstand wird abgegossen und die Hefe jeweils in 100 ml frischem Nährmedium, welchem 5 μ Ci 14 C-Inosin zugesetzt sind, resuspendiert. Die Hefe wächst in dem mit markiertem Inosin versetzten Medium für genau 5 Minuten unter Standardbedingungen. Hier wird 14 C-Inosin als Precursor der Purinnucleotidsynthese verwendet. Wird Adenosin oder Guanosin als markiertes Substrat eingesetzt, so ist nicht auszuschließen, daß der entsprechende Phosphatpool auf Grund der günstigeren Ausgangssubstanz unverhältnismäßig stark markiert wird, so daß das Verhältnis Adenosinphosphate zu Guanosinphosphaten nicht nur von den Regulationsmechanismen, sondern auch vom Ausgangssubstrat geprägt wird. Anschließend wird die Suspension durch ein Sartorius-Membranfilter abgesaugt und 2 mal mit eiskalter 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Die Hefe wird mit einem kleinen Spatel vom Filter abgekratzt, gewogen, in eiskalter 6 %iger HClO₄-Lösung suspendiert und 1/2 Stunde tiefgefroren. Das Einfrieren erhöht die säurelösliche Extraktmenge ohne die Extraktzusammensetzung zu verändern. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf einer Zellwandschädigung (PFLÜGER).

Nach dem Auftauen wird die Hefe 1/2 Stunde bei 2° C gerührt und anschließend in der Christzentrifuge bei 2° C und 15.000 U/Min ($\hat{=}$ 3000 x g) abzentrifugiert. Durch die Zentrifugation an dieser Stelle wird der anschließende Neutralisationsvorgang wesentlich vereinfacht. Wird bei der Neutralisation in Gegenwart von Hefe übertitriert, so wird der Anteil an extrahierbaren Zellbestandteilen deutlich vergrößert.

In späteren Versuchen hat sich gezeigt, daß eine saubere Trennung über die Aminoboronsäuresäule nach Übertitrieren ($\sim$ pH 10 - 12) nicht mehr möglich ist. Durch die Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich werden RNA-Fractionen aus der Zelle gelöst (PFLÜGER mündl. Mitteilung), die mit dem Borsäuremolekül nicht komplexieren und deshalb mit der Desoxy-ribonucleotidfraktion eluiert werden.

Die Neutralisation wird mit 10 n, 5 n und 0,5 n KOH durchgeführt, das ausgefallene Perchlorat wird abzentrifugiert und der Überstand gefriergetrocknet. Der gefriergetrocknete Rückstand wird mit 10 ml H_2O aufgenommen, 2 ml werden sofort auf die PEI Cellulose-Säule aufgetragen bzw. tiefgefroren ($\hat{=}$ "1/5 Gesamtextrakt"), die restlichen 8 ml werden mit 10 ml Morpholinpuffer pH 8.9 versetzt und auf die Aminoboronsäuresäule gepumpt.

Versuch B:

In Abänderung zu Versuch A wird die radioaktiv markierte Inosinkonzentration stark erhöht. 10 μ Ci U ^{14}C -Inosin und 15 μ Ci ^{14}C -Inosin werden in 100 ml Nährlösung gegeben. Dieses "aktive" Nährmedium wird bei jedem Zeitpunkt wieder für die 5-minütige Kurzzeitmarkierung verwendet. Der Flüssigkeitsverlust durch das Absaugen und mehrmalige Umgießen in die verschiedenen Gefäße beträgt nach den 6 Proben 6 %, der Aktivitätsverlust ist geringer als 15 % (s. Tab. 1).

Dieser Aktivitätsverlust im Verlauf des Versuches ist bei der Berechnung der Ergebnisse nicht mit berücksichtigt worden.

Tabelle 1: Volumen- und Aktivitätsverlust bei Wiederverwendung der Nährlösung

Zeit (Min)	Volumen (ml) nach dem Absaugen	Aktivität von je 0,1 ml Nährlösung in 10 ml Szintillator Counts/Min		Aktivitäts- verlust in Prozent
0.	100 ml	38.985 40.457	39.721	
120.	99	38.294 39.053	38.674	2,64
140.	98	37.301 37.037	37.169	6,43
160.	96	36.714 36.161	36.439	8,27
180.	95	36.641 36.034	36.338	8,52
200.	95	35.660 35.802	35.731	10,01
240.	94	34.468 33.688	34.078	14,21

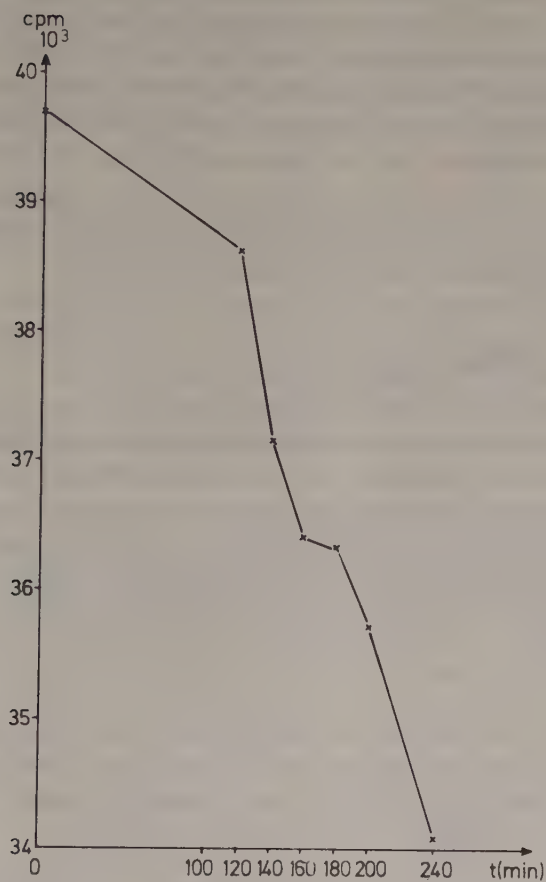


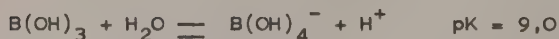
Abb. 7: Aktivitätsverlust bei Wiederverwendung des Nährmediums. Nach dem Absaugen der Hefezellen wird die Aktivität von jeweils 0,1 ml des Filtrats in 10 ml Szintillatorflüssigkeit gemessen.

Versuch C:

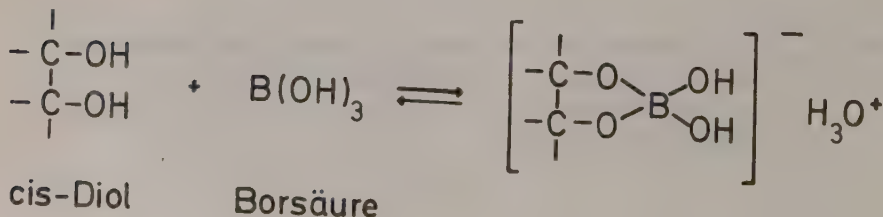
Es wird eine Langzeitmarkierung mit ^{14}C -Inosin durchgeführt, um die Auswirkungen von Cykloheximid auf die Nucleotidsynthese beurteilen zu können. Der Versuchsablauf ist in großen Teilen mit Versuch A identisch. In der 100. Min. wird zu 600 ml Hefesuspension 50 μCi ^{14}C -Inosin hinzugefügt. Die Abnahme der Zellsuspension (jeweils 100 ml) erfolgt in der 120. und 140. Min. In der 145. Min. werden 200 ml Hefesuspension mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Cykloheximid versetzt. Sowohl von der Kontrolle als auch von der Suspension, die Cykloheximid enthält, werden zur 190. Min. und zur 195. Min. je 100 ml entnommen und aufgearbeitet.

4.2. Die Aminobenzolboronsäure-Säule

BOESEKEN hatte 1913 eine Testmethode entwickelt, die die Konfiguration eines Glykols mit 2 benachbarten Hydroxylgruppen mit Hilfe von Borsäure ermittelt. Der prozentuale Anteil der cis-Glykolgruppen wird beim Boeseken-Test titrimetrisch gegen Phenolphthalein bestimmt. Borsäure ist eine so schwache Säure, daß sie in Wasser nicht als Säure durch Abgabe von Protonen, sondern als Lewis-Säure durch Aufnahme von Hydroxylionen wirkt.



Eine vergleichbare Reaktion spielt sich bei der Komplexbildung mit cis-Diolen ab. Der Komplex ist einfach negativ geladen und das dazugehörige Proton ist mit jeder Lauge titrierbar. Der Boeseken-Test verwendet zu Titration 0,01 n NaOH.

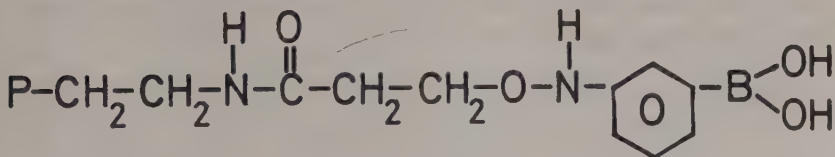


Weitergeführt wurden diese Versuche dann von R.S. TIPON (1945) und G.R. BARKER (1956), die die Methode auch schon für Nucleoside und Nucleotide anwendeten.

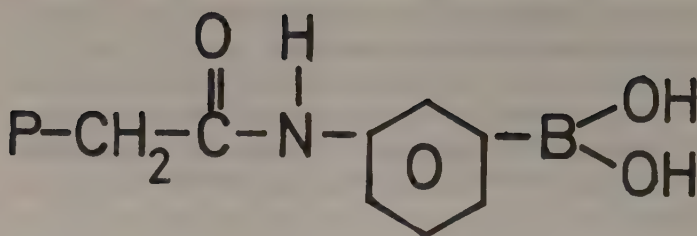
KHYM (1967) verbindet die Möglichkeit mit Hilfe der Borsäure cis-Glykolgruppen von Zuckern ohne benachbarte cis-ständige Glykolgruppen zu trennen mit der Elektrophorese. Auf diese Weise kann er die Ribose- und Desoxyribosefraktion noch weiter auftrennen.

Einen anderen Weg beschreiten SOLMS et al. (1957), die eine Dihydroxyborylgruppe mit einem unlöslichen Polymer in der Absicht verbinden, damit säulenchromatographisch Polyhydroxygruppen zu isolieren; und auch LETZINGER (1959) beschreibt die Synthesemöglichkeit eines Polymers vom sogenannten "Popcorn-Typ", das eine Dihydroxyborylgruppe als aktiven Liganden hat. Genaue Untersuchungen der Interaktionen dieser Harze mit Zuckern oder anderen Verbindungen mit cis-Glykolgruppen sind nicht veröffentlicht worden.

Erst WEITH et al. (1970) beschrieben die Synthese der N-[N'-(m-dihydroxyborylphenyl)succinamyl]aminoethylcellulose und der N(m Dihydroxyborylphenyl)carbamylnethylcellulose und untersuchen systematisch die Trenneigenschaften dieser Harze für verschiedene Glykolverbindungen.



N-[N'-(m-dihydroxyborylphenyl)succinamyl]aminoethylcellulose



N(m Dihydroxyborylphenyl)carbamylmethylcellulose

Während ihrer Untersuchungen finden WEITH et al. 4 Faktoren, die die Trennung der aufgetragenen Substanzen wesentlich beeinflussen:

1. die Gegenwart des cis-Glykol-Systems:

Bei einer trans-Konfiguration ist der Abstand der beiden Hydroxylgruppen zu groß, um mit dem Boratliganden einen Komplex zu bilden.

2. der pH-Wert des Elutionsmediums:

Die Bindung der Ribonucleotide mit der Borsäure ist bei einem alkalischen pH-Wert wesentlich fester als im neutralen oder schwach sauren Bereich, bei einem pH-Wert unter pH 6.0 wird die Bindung wieder gelöst. Der pK-Wert der Phenylboronsäure wurde mit $pK = 8,86$ bestimmt, d. h. bei einem pH-Wert von 8,86 liegen 50 % aller Phenylboronsäuremoleküle als Anion vor. Dieses Anion komplexiert nun wesentlich leichter mit einer cis-Diolgruppierung, was schon aus der ähnlichen sterischen Anordnung des Komplexes und des Anions erklärlich ist.

3. die Ionenstärke des Eluens:

Für die besseren Trenneigenschaften ihres Harzes in Gegenwart von verschiedenen Ionen machen WEITH et al. vor allem Feld-Effekte verantwortlich. In der Gerüstsubstanz befinden sich mehrere Molekülgruppen mit einem induktiven und mesomeren Effekt. Durch elektronenanziehende Gruppen in Nachbarschaft des Dihydroxyborsäuremoleküls wird der pK-Wert heraufgesetzt. Dieser Feldeffekt soll durch den Zusatz von Fremdsalzen vermindert werden.

4. die Base bei der Auftrennung von Nucleosiden und Nucleotiden:

Die Elution der Desoxyribosen wird durch die beschriebenen Veränderungen des pH-Wertes und des Elutionsmittels kaum beeinflusst. Geringe Anlagerungserscheinungen an das Cellulosegerüst sind zu beobachten, spielen aber für die hier beschriebenen Versuche keine Rolle, da die pH-Wert-Änderung erst erfolgt, wenn im UV-Bereich keine Absorption der 1. Fraktion mehr meßbar ist. Die verschieden starke Anlagerung der Desoxynucleoside an das Harz beobachten auch schon WEITH et al. Bei der Elution von Thymidin, Desoxycytidin, Desoxyguanosin und Desoxyadenosin mit 0,05 m N-Methylmorpholinium-Cl, das mit 1 m Natriumacetat versetzt und auf pH = 7.5 eingestellt ist, werden Thymidin und Desoxycytidin mit 56 ml Elutionsflüssigkeit extrahiert, Desoxyguanosin mit 72 ml und Desoxyadenosin mit 74 ml.

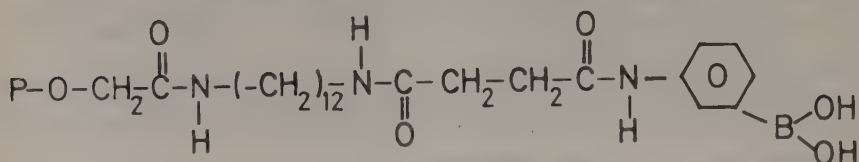
Auch unter unseren Bedingungen können wir eine schwache Retention der Substanzen ohne cis-Glykolgruppe beobachten. Wir nennen in unseren Versuchen diesen 1. Peak der Einfachheit halber "Desoxyribose-Peak", sind uns aber bewußt, daß hier auch alle anderen säurelöslichen Substanzen unseres Hefeextraktes ohne cis-Diolgruppen, die bei 260 nm absorbieren, photometrisch mit-erfaßt werden, wie z.B. einige Aminosäuren und Riboflavin.

Nach dem Auftragen werden ungefähr 25 ml Morpholinpuffer pH 8.9 gebraucht, um alle Substanzen ohne cis-Diolgruppen zu eluieren, obwohl das ganze System (Säule, Schläuche, Meßeinheit) nur 7 ml Inhalt hat. Würde es also keine Interaktionen zwischen Desoxyribosen und Säulenmaterial geben, so müßten, nachdem 7 ml Puffer durch das System gepumpt sind, alle Desoxyribosen eluiert sein. Genauere Untersuchungen, wie stark die einzelnen Nucleotide retentiert werden, wurden nicht gemacht, da der Peak ja als Ganzes auf die PEI-Cellulosesäulen aufgetragen wird und hier eine wesentlich exaktere Fraktionierung der Nucleotide erfolgt. (Genaue Versuchsbeschreibung s. S. 42).

Von der Firma Merck ist nun ein Harz entwickelt worden, bei dem sich die Seitenkette, an die die Phenylboronsäure gebunden ist, von den vorher beschriebenen Ionenaustauschern unterscheidet.

Es handelt sich um eine succinylierte Aminododecylcellulose die nach W. BRÜMMER (1974) folgende Vorteile gegenüber den bisher verwendeten Austauscherharzen hat:

1. Bessere Kapazität,
2. Höhere Austauschfähigkeit
3. Größere pH-Stabilität
4. Wiederverwendbarkeit.



3 Aminobenzolboronsäure gebunden an succinylierte Aminododecylcellulose (= SADC).

4.2.1. Vorbereiten der Säule:

2 g Säulenmaterial werden mit ungefähr 10 ml Morpholinpuffer pH 8.9 (genaue Zusammensetzung s. Material und Methoden) in einem Reagenzglas mit seitlich angesetztm Stutzen vorsichtig geschüttelt bis das Säulenmaterial sich gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt hat. (Wird das grobkörnige Material mit dem Magnetrührer gerührt, so wird das Material so fein, daß die Säulen sehr schnell verstopfen.)

Das Reagensglas wird mit einem Gummistopfen verschlossen und ungefähr 5 Min. an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen, um das Material und den Puffer zu entgasen. Als Säule wird ein einfaches Glasrohr (180 mm x 7 mm) benutzt. Das Glasrohr läuft als Auslauf ungefähr 3 cm lang konisch zu, so daß hier leicht ein dünner Polyäthylenschlauch angeschlossen werden kann. Zu Beginn des konischen Teile liegt ein kleines Stück Isolierwolle

als Filter, die das Säulenmaterial daran hindert, durch das Glasrohr in den Schlauch zu gelangen. Das Chromatographierohr wird mit einem Trichter verbunden, mit Morpholin-Puffer pH 8.9 gefüllt, und die SADC-Harz-Suspension wird in den Trichter gefüllt. Nach ungefähr 1/2-stündigem Absitzen ist das meiste Säulenmaterial in das Glasrohr gesunken, die Schlauchklemme wird geöffnet und die überstehende Flüssigkeit tropft ab. Über dem Säulenbett verbleibt 2 cm Flüssigkeit, damit durch eine eventuelle Luftblase beim Wechseln der Puffer das Harz nicht sofort austrocknet. Als "Säulenkopf" dient ein dickerer weicher Polyäthylenschlauch, der einfach über das Glasrohr gezogen wird, und den ein Reduzierstück mit dem dünneren Pumpenschlauch verbindet.

4.2.2. Durchführung der Trennung

Die zu trennenden Hefeextrakte und die Puffer werden mit einer Bühler-Pumpe durch die Säule gepumpt. Der Flow beträgt 0,4 ml/Min. Die Extinktion des Eluats wird fortlaufend mit einem LKB-Meßgerät bei 260 nm gemessen und mit einem Zeiss-Schreiber bei einer Vorlaufgeschwindigkeit von 1 cm/Min. aufgezeichnet. Die austropfende Flüssigkeit in Reagensgläsern mit Hilfe eines LKB-Ultra-Rac-Sammlers aufgefangen. Geschwindigkeit: 1 Reagensglas/5 Min.

Die Kapazität des Säulenmaterials beträgt nach W. BRÜMMER (1974) 5 mg Adenosin/ml Säulenbett. Bei unseren Trennungen des Hefeextraktes reichen 3 ml Säulenbett nicht aus, um mit Sicherheit eine vollständige Trennung der Desoxyribosen und Ribosen zu erreichen. Ein Hefeextrakt wird deshalb immer auf 2 Säulen gleichzeitig aufgepumpt, die Eluate dann aber wieder vereinigt.

Nach dem Auftragen des Hefeextraktes wird die Säule so lange mit Morpholinpuffer pH 8.9 gespült, bis der erste Peak mit Sicherheit beendet ist. Anschließend wird der Morpholinäthansulfonsäure-Puffer pH 5.8 (= MES) aufgetragen, und nach der pH-Wert-Änderung in der Säule erscheint der steile Ribosepeak.

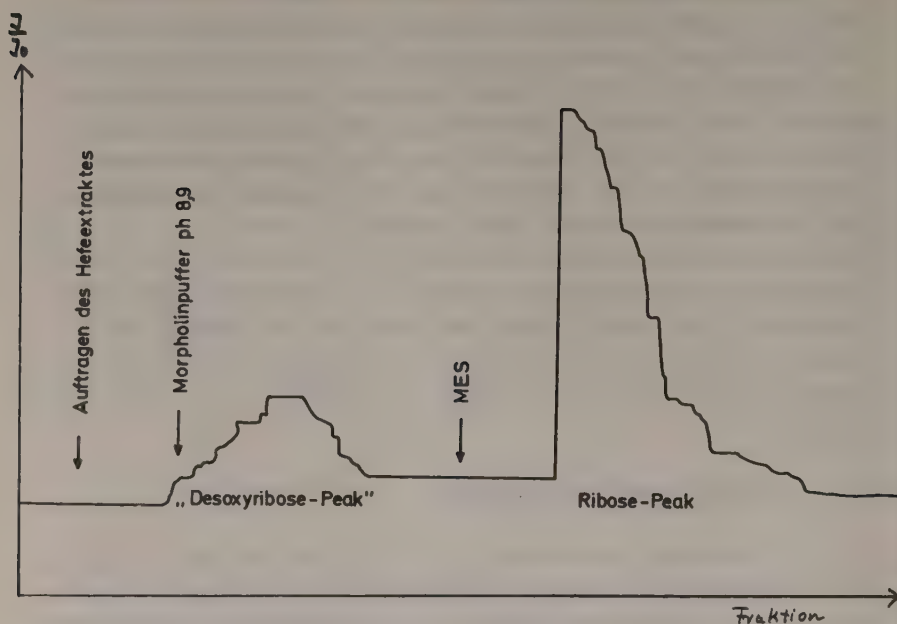


Abb. 8: Trennung des säurelöslichen Extraktes von 77 mg Hefe.

4.3. Aufarbeitung der Eluate der Aminoboronsäure-Säule

Schwierigkeiten ergaben sich bei der Übertragung des Ribose- und des Desoxyribose-Peaks von der Dihydroxyboronsäuresäule auf die PEI-Cellulose-Säule. Die Extinktionskurven von der PEI-Cellulose-Säule waren sehr unscharf, die einzelnen Peaks sehr breit und schon im Monophosphatbereich war eine eindeutige Zuordnung der Peaks nicht möglich. Genaue Arbeitsweise der PEI-Cellulose-Säule s. PFLÜGER und Material und allgemeine Methoden. Um die störenden Faktoren zu eliminieren, wurden folgende Versuche durchgeführt:

4.3.1. Änderung des Elutionspuffersystems für die Aminoboronsäure-Säule

In der Literatur wird verschiedentlich angegeben, daß lediglich der pH-Wert für die Komplexbindung der Ribonucleotide mit der Borsäure eine Rolle spielt. So verwendet REICHARD (1958) bei der elektrophoretischen Trennung von Desoxyribocytidin und Ribocytidin einen Puffer folgender Zusammensetzung:

20 ml NH_4 Acetat pH 9.5
800 ml gesättigte Natriumtetraborat-Lösung
220 ml Äthanol
0,5 ml EDTA

und auch KHYM führt seine Versuche mit Ammoniumacetat-Puffer durch.

Da die puffernde Substanz möglichst leicht aus dem Eluat - jedenfalls des Desoxyribosepeaks - zu entfernen sein sollte, wurde zunächst die Trennung mit verdünnter Ammoniaklösung pH 9.2 durchgeführt.

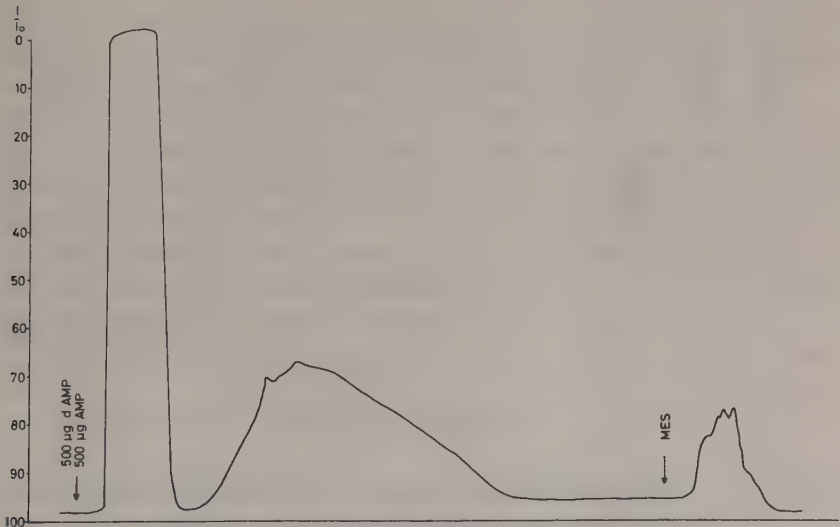


Abb. 9: Trennung von 0,5 mg dAMP und 0,5 mg AMP über die Aminoboronsäure-Säule mit verdünnter Ammoniaklösung.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß schon der größte Teil des rAMP mit Zunahme des Elutionsvolumens ausgewaschen wird. Die Komplexbindung zwischen der Ribose und der Borsäure ist also verhältnismäßig schwach. Durch ständige pH-Wert-Messung wurde festgestellt, daß der pH-Wert während des Versuchs auf pH 8.5 abfällt, was aber allein vom pH-Wert her keine Beeinträchtigung des Trennergebnisses hervorrufen dürfte. Bei einem Pufferwechsel auf pH 5.5 (Morpholinäthansulfonsäurepuffer) wird das noch gebundene rAMP eluiert. Auch ein NH_4HCO_3 -Puffersystem (NH_4HCO_3 läßt sich durch Sublimation im Vakuum bei 60°C leicht entfernen) bringt keine besseren Ergebnisse.

Versuche mit Tris-Puffer wurden mit und ohne Magnesiumchlorid-zusatz durchgeführt.

Tris-Puffer pH 8.9 (1 m):



Abb. 10: Trennung des säurelöslichen Extraktes von 100 mg Hefe über die Aminoboronsäure-Säule mit Trispuffer pH 8.9

Die Abbildung zeigt, daß eine saubere Trennung des säurelöslichen Hefeextraktes mit Trispuffer pH 8.9 nicht möglich ist. Auch ein Zusatz von 0,1 m $MgCl_2$ verbessert das Trennergebnis nicht.

Die beiden Versuche zeigen deutlich, daß nicht allein der pH-Wert, sondern das ganze puffernde System für die Trenneigenschaften der Aminoboronsäure-Säule verantwortlich ist.

4.3.2. Entfernen von Morpholin durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln

Die Löslichkeit von Morpholin in verschiedenen organischen Lösungsmitteln wird bestimmt und Chloroform von den laborüblichen, mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln als das Geeigneteste ermittelt. Morpholin ist unbegrenzt in Alkohol und Aceton löslich, beide Lösungsmittel sind aber für diesen Zweck unbrauchbar, da sie sich unbegrenzt mit der Elutionsflüssigkeit mischen.

Das Eluat des 1. Peaks der Aminoboronsäuresäule wird im Verhältnis 1 : 10 mit $CHCl_3$ ausgeschüttelt und auf die PEI-Cellulose-Säule aufgetragen. - Das Trennergebnis ist schlecht, die Peaks sind sehr breit und flach, da schon Spuren von $CHCl_3$ die Trenneigenschaften der PEI-Cellulose beeinträchtigen. Außerdem ist die Löslichkeit der Nucleotide in Chloroform unterschiedlich. Bei den von uns untersuchten Substanzen löst sich ATP etwas besser in Chloroform als AMP und dieses ist löslicher als UMP. Für eine quantitative Untersuchung der Nucleotide ist diese Methode also nicht brauchbar.

4.3.3. Fällung der Nucleotide mit Aceton

Bei größeren Eluatmengen wirkt sich vor allem auch das Cl^- -Ion des Morpholinpuffers sehr störend bei der Trennung über die PEI-Cellulose-Säule aus. Bei höheren Cl^- -Ionen-Konzentrationen

werden die Substanzen, die kurz nach Anschließen des NaCl-Gradienten bei der Trennung über die PEI-Cellulose-Säule erscheinen, schon im Vorlauf eluiert.

Eine Methode sowohl Morpholin als auch $MgCl_2$ von den Nucleotiden zu trennen, ist die Fällung der Nucleotide mit Aceton bei $-20^{\circ}C$. Das Verhältnis Eluat : Aceton beträgt 1 : 10. Im Versuch wird wie folgt verfahren: Die Eluate des Desoxyribose Peaks und des Ribose-Peaks werden je mit der entsprechenden Menge Aceton versetzt und ungefähr 14 Std. im Tiefgefrierschrank belassen. Bei den Ribosen fällt ein voluminöser Niederschlag aus, während bei dem Desoxyribosepeak bei unseren Extraktmengen fast gar kein Niederschlag zu beobachten ist. Der Niederschlag wird in der Christzentrifuge bei $15.000 \times U$ ($\approx 15000 g$) abzentrifugiert, in Aqua bidest gelöst und auf die PEI-Cellulose-Säule aufgetragen. Dieses Verfahren eignet sich für die Ribosen sehr gut, während die Fällung der Desoxyribosen nicht quantitativ ist. Da wir vornehmlich an der Zusammensetzung der Desoxyribosen interessiert sind, wurde von dem Verfahren Abstand genommen.

Eine Fällung der Cl^{-} -Ionen mit Silbersalzen wurde nicht in Erwägung gezogen, da der Silberchloridniederschlag so voluminös ist, daß er einen Teil der Nucleotide adsorbiert.

4.3.4. Säulenchromatographische Trennung

In der Literatur findet man mehrere Verfahren, Cl^{-} -Ionen säulenchromatographisch aus einer Lösung zu entfernen. So entsalzen Th. DOUGHESTY et al. (1969) Hydrolyseprodukte von DNS und RNS Nucleoside und Basen über eine Poly-N-vinyl-pyrrolidon-Säule mit destilliertem Wasser als Eluens. Bei diesem Versuch liegt der Chloridpeak zwischen den Nucleotiden und Basen (Uridin) und überlappt beide, so daß die Eluate, vor allem bei einer etwas schlechten Trennung zu viele Cl^{-} -Ionen enthalten. Eine andere Möglichkeit wird von URIEL et al. (1965) mit der Gelfiltration vorgeschlagen. Die meisten Gele trennen nur Salze von Molekülen, die wesentlich größer als die Mononucleotide

sind (UZIŁ et COHN, Federation Proc. 1965).

Durch Polyacrylamide werden aber Nucleotide recht brauchbar von Cl^- -Ionen getrennt. Auch hier werden die Cl^- -Ionen zwischen den Nucleotiden und Basen eluiert. der Nucleotidpeak ist aber vor Beginn des Cl^- -Peaks vollkommen abgeschlossen. Der Cl^- -Peak ragt dann sehr weit in den Basen-Peak herein, da wir aber bei unseren Untersuchungen primär nicht an den Basen interessiert sind, wählten wir zum Entsalzen diese Möglichkeit.

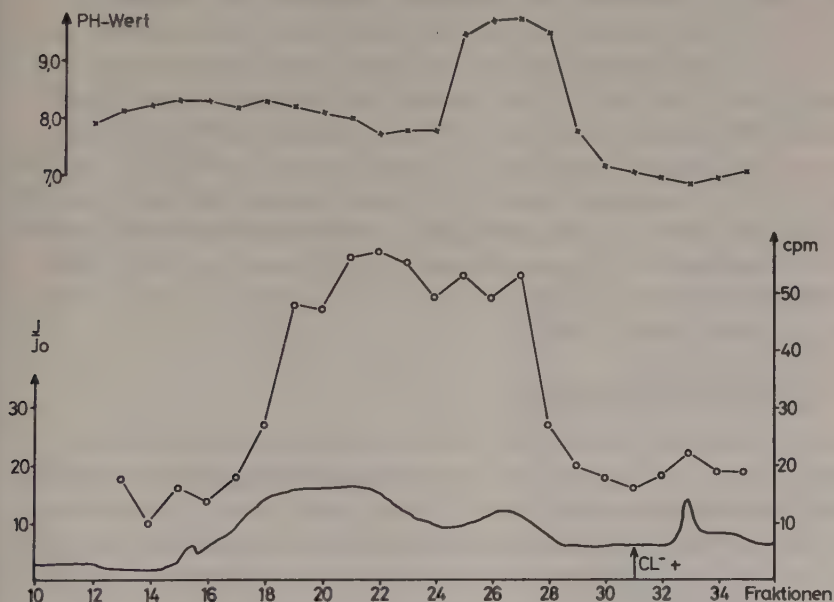


Abb. 11: Diagramm einer Trennung über die Bio-Gel-Säule.

— Extinktion bei 260 nm; x - x pH-Wert; o - o Radiochemische Messung von 0,2 ml jeder Fraktion in 10 ml Szintillatorflüssigkeit.

Arbeitsweise mit der Bio-Gel-Säule:

Für das Entsalzen wird Bio-Gel P 400 verwendet. Das Material wird gewaschen, die feinen Partikel werden mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Suspension entgast. Das Material wird durch einen Trichter vorsichtig in eine mit H_2O gefüllte Säule

(50 cm x 2,2 cm) geschüttelt und sitzt über Nacht ab. Das überstehende Wasser tropft nach Öffnen der Schlauchklemme ab. Als Meßeinheit dient hier ein LKB-Gerät (Extinktion = 260 nm), die Extinktion wird von einem Beckmann-Schreiber aufgezeichnet. (Vorlauf: 1,25 cm/5 Min.). Die Proben werden mit einem LKB 7000 A Ultra-Rac gesammelt. Flow: 0,8 ml/Min.

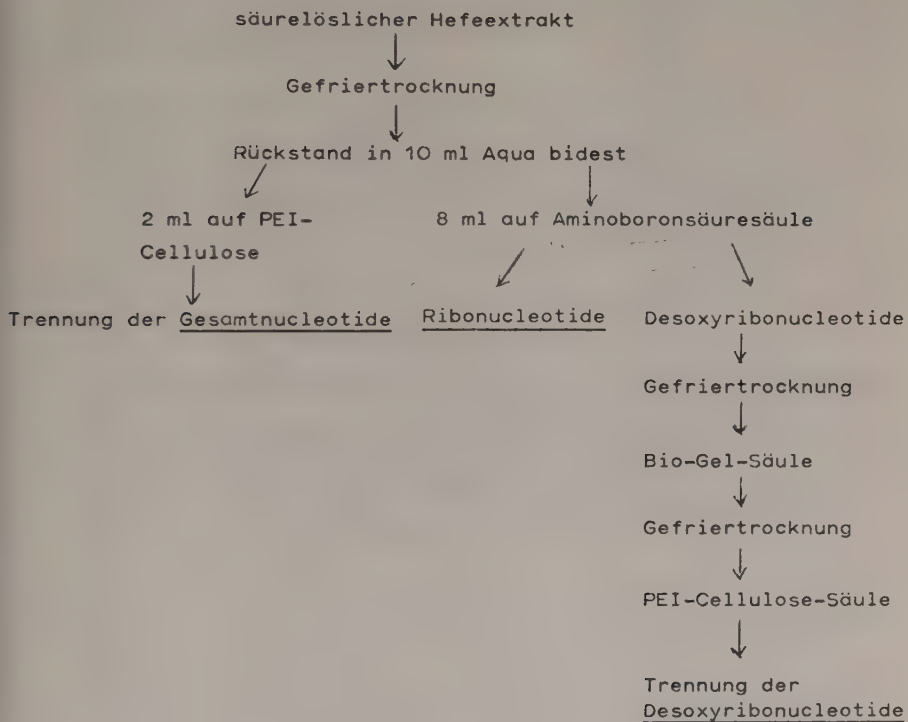
Im Versuch wird wie folgt verfahren: Das Eluat des Desoxyribose-Peaks der Aminobenzolboronsäure-Säule (~25 ml) wird vereinigt und gefriergetrocknet. Der Rückstand wird mit wenig Wasser (2 - 3 ml) aufgenommen und auf die Säule, auf der möglichst gerade keine Flüssigkeit mehr überstehen sollte, aufgetragen. Das Gefäß wird 2 mal mit je 1 ml Wasser nachgewaschen. Die Lösung sickert in das Gel ein, und die Pumpe wird in dem Moment ange stellt, in dem die Oberfläche der Säule gerade noch nicht trocken ist. Um eine möglichst saubere Trennung zwischen den Nucleotiden und den Cl^- -Ionen zu erhalten, wird genau darauf geachtet, daß die aufgetragene Lösung nicht unnötig mit Wasser verdünnt wird, da die Trennung der Nucleotide von den Cl^- -Ionen nur mit Hilfe des Wasservolumens erfolgt.

4.4. Die PEI-Cellulose-Säule:

Die Arbeitsweise mit der PEI-Cellulose-Säule wurde genau von PFLÜGER (s.a. Allg. Methoden) übernommen. Das Eluat der Bio-Gel-Säule wird gefriergetrocknet, in wenig Aqua bidest aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Die Gefriertrocknung erfolgt nur, um die Zeit des Auftragens zu verkürzen, da sonst 40 - 50 ml Eluat von der Bio-Gel-Säule aufgetragen werden müßten. Das Eluat der PEI-Cellulose-Säule wird mit dem LKB-Sammler 7000 A Ultra-Rac in 10-minütigen Fraktionen gesammelt. Der Flow beträgt 16 ml/h. 1 ml jeder Fraktion wird in 10 ml Szintillatorflüssigkeit gegeben und im Mark I 4 Minuten gezählt. Die cpm-Werte bezogen auf 1 Gramm Hefe sind in den Tabellen und Kurven eingetragen.

Kurzgefaßter Versuchsablauf:

Der Ablauf eines Versuches läßt sich mit folgenden Stichworten zusammenfassen:



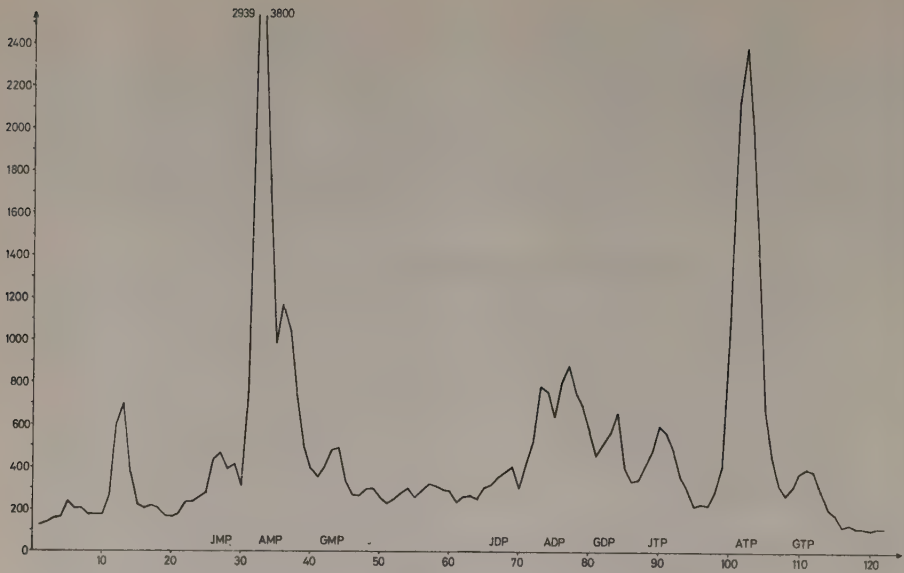


Abb. 12: Beispiel einer Trennung von Desoxyribosenucleotiden auf der PEI-Cellulose-Säule.

Die Probe wurde in der 145. Min. mit ^{14}C -Inosin markiert, die Abnahme erfolgte in der 190. Minute.
Aufarbeitung s. oben.

5. Ergebnisse der Trennung von Desoxyribonucleotiden und Ribonucleotiden

Mit der in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Methode wurde der Stoffwechsel der Ribo- und Desoxyribonucleotide im Verlauf des Zellzyklus von *Saccharomyces cerevisiae* mit und ohne Hemmung durch Cykloheximid untersucht. Hierzu wurden folgende Versuche durchgeführt:

I. Zwei Versuche mit Kurzzeitmarkierung (s. S. 26)

(5 Min. vor dem jeweils angegebenen Zeitpunkt wurde die Hefe in das ^{14}C -Inosin enthaltende Medium für genau 5 Minuten gegeben). Die Abnahme der Hefe erfolgte in der 120., 140., 160., 180., 200. und 240. Minute. Aufarbeitung der Hefe entsprechend Versuchsdurchführung A und B in Kapitel 4.

II. Vier Versuche mit Langzeitmarkierung (s. S. 27)

(die Hefe wuchs in dem ^{14}C -Inosin enthaltenden Medium ab der 100. Minute). Ein Teil der Hefesuspension wurde ab der 145. Minute mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Cykloheximid gehemmt. Abnahme der Proben in der 120., 140. und 195. Minute für die Kontrolle und 195. Minute für die gehemmte Probe. Die Aufarbeitung der Proben entspricht der Beschreibung in Kapitel 4.

Die Desoxynucleotide wurden so aufgearbeitet, daß vom Gesamtextrakt 4/5 über die Aminoboronsäuresäule aufgetrennt wurde. Für die Bestimmung der Ribonucleotide ist nicht das durch die Aminoboronsäuresäule abgetrennte Eluat verwendet worden, sondern jeweils das restliche Fünftel des Gesamtextraktes. Die Werte der Desoxyribonucleotide und Ribonucleotide sind jeweils auf 100 % Gesamtextrakt und 1 g Hefegewicht umgerechnet worden. Dabei stellen die Veränderungen der Nucleotide des Gesamtextraktes praktisch die Änderungen der löslichen Ribonucleotide dar, da der Anteil der Desoxyribonucleotide an den Gesamtnucleotiden geringer als 10 % ist. Eine Substraktion der cpm-Werte der Desoxyribonucleotiden von den Gesamtnucleotiden erfolgte nicht.

Die Ergebnisse aller Versuche werden aus den Tabellen am Schluß der Arbeit deutlich.

5.1. Verhalten der Gesamtnucleotide bei Kurzzeitmarkierung

Die Bildung und Zusammensetzung der löslichen Nucleotide im Verlauf des Zellzyklus unterliegt deutlich rhythmischen Schwankungen (Abb.13).

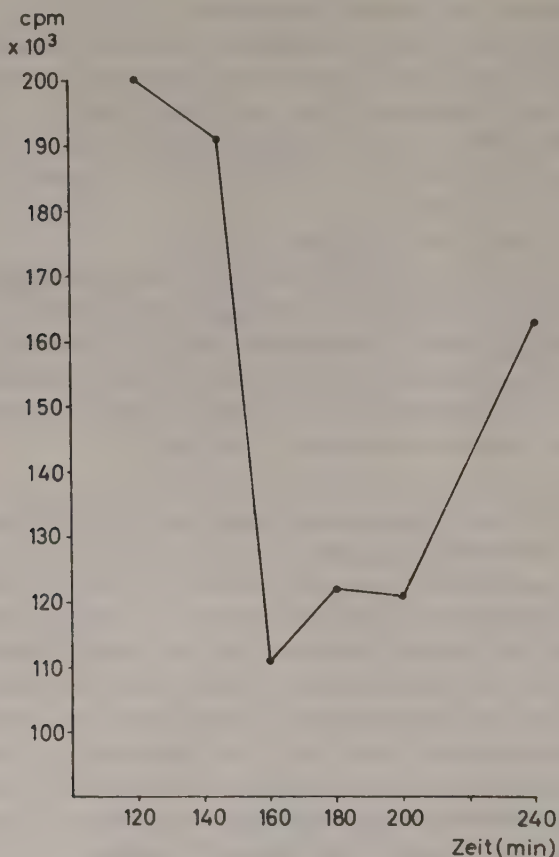


Abb. 13: Gesamtcounts (Addition der cpm-Werte der markierten Mono-, Di- und Triphosphate) der löslichen Nucleotide des Hefeextraktes im Zellzyklus bei einer Kurzzeitmarkierung von 5 Minuten.

Betrachtet man die Mittelwerte der Gesamtcounts aus 2 Versuchen des Extraktes der löslichen Nucleotide bei der 5-minütigen Kurzzeitmarkierung zu den in Abb. 13 unterzeichneten Zeitintervallen, so fällt die unterschiedliche ^{14}C -Aktivität im Verlauf des Zellzyklus auf. In der 120. und 140. Minute ist die Markierung fast doppelt so stark wie in der 160. Minute, steigt in der 180. und 200. Minute wieder geringfügig an und erreicht in der 240. Minute mehr als 80 % des Wertes der 120. Minute.

Während die RNA-Synthese (Abb.4) in der 120. Minute exponentiell verläuft, bildet sie zwischen der 160. und 200. Minute ein Plateau; eine Vermehrung der RNA findet in diesem Zeitraum also so gut wie nicht statt. Der Einbau von markiertem Inosin in den Nucleotidpool beträgt zu eben dieser Zeit zwischen 55 und 60 % der Werte der 120. und 140. Minute.

Man kann nun annehmen, daß dieses Plateau in der RNA-Synthese durch den verkleinerten Pool an löslichen Ribonucleotiden hervorgerufen wird. Hinzu könnte kommen, daß kurz vor Beginn der S-Phase der Energiestoffwechsel gedrosselt wird. SCOPES beobachtete, daß die O_2 -Aufnahme einer synchron wachsenden *Saccharomyces cerevisiae*-Kultur rhythmischen Schwankungen ausgesetzt ist. Kurz vor und während der DNA-Reduplikation folgt die Sauerstoffaufnahme einem Plateau. Der Abfall der energiereichen Phosphate ist somit auch auf die verringerte O_2 -Aufnahme zu Beginn der S-Phase zurückzuführen.

Die Monophosphate haben ihre höchste Konzentration in der 120. Minute und nehmen schon in der 140. Minute um ungefähr 20 % ab, um in der 160. Minute nur noch 50 % der Ausgangskonzentration zu haben (Abb. 14). Der Einbau von ^{14}C -Inosin in den Monophosphatpool steigt schon um die 180. Minute wieder an, zu einem Zeitpunkt, in dem die Triphosphate ihren niedrigsten Wert haben und die Diphosphatkonzentration nur 60 % des Wertes der 120. Minute beträgt. Man könnte deshalb annehmen, daß die Änderungen im Monophosphatpool denen des Di- und Triphosphatpools vorauslaufen.

Die Diphosphate stellen den geringsten Anteil am löslichen Nucleotidpool dar. Auch hier ist die Markierung zu Beginn der S-Phase wesentlich geringer (40 % des Wertes in der 120. Minute). Diese Konzentration ändert sich während der 180. und 200. Minute nur geringfügig und fällt in der 240. Minute auf einen Wert von unter 50 %.

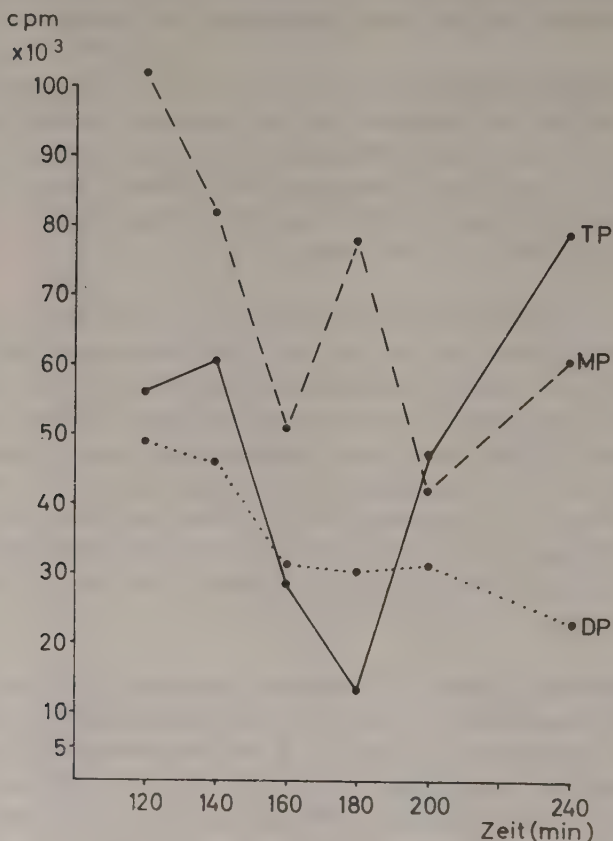


Abb. 14: Einbau von ^{14}C -Inosin (Kurzzeitmarkierung) in die Mono-, Di- und Triphosphate der Gesamtnucleotide im Verlauf des Zellzyklus.

Die starken Veränderungen im Triphosphatpool zu Beginn der S-Phase stimmen gut mit dem von SCOPES beschriebenen Rückgang des Energiestoffwechsels zu Beginn der DNA-Vermehrung überein. Ein großer Teil der Triphosphate wird ja zur Energieübertragung verwendet.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für den Rückgang des Gesamtnucleotidpools wäre die Annahme einer unterschiedlichen Aufnahme von Substrat (in diesem Fall von ^{14}C -Inosin) aus dem Nährmedium im Verlauf des Zellzyklus. In Abb. 15 ist die Aufnahme von ^{14}C -Inosin durch die Hefezellen aus der Nährlösung dargestellt. Dazu wurde in Versuch B (s. S.) die Aktivität des Filtrates nach der jeweiligen Markierungszeit bestimmt und der Wert vom vorhergehenden subtrahiert. Die Zunahme von Hefegewicht und Zellzahl blieb unberücksichtigt.

Aus dieser Abbildung wird deutlich, daß die Hefe in der Zeitspanne 175. - 180. Minute nur sehr wenig ^{14}C -Inosin aus dem Nährmedium entnimmt. Eine unterschiedliche Aufnahme von Substraten im Verlauf eines Zellzyklus' konnte auch für ^3H -Actinomycin bei Tetrahymena (CLEFFMANN) gezeigt werden, ebenso sind rhythmische Schwankungen der Glukose- (GOLOMBECK) und Sauerstoffaufnahme (SCOPES) bei Saccharomyces bekannt. Eine Beeinflussung der Permeation von ^{14}C -Inosin durch Cycloheximid wird später gezeigt.

Es war mir nicht möglich zu klären, ob die verminderte RNA-Synthese, der geringere Energiebedarf oder die kleinere Aufnahme die Hauptursache für die geringere Nucleotidkonzentration darstellt.

Werden die Gesamtnucleotide nach dem Phosphatoxylierungsgrad aufgeschlüsselt, so wird deutlich, daß die stärksten Schwankungen den Triphosphatpool betreffen. Hier muß aber beachtet werden, daß der Anteil der Triphosphate stark von der Aufarbeitung der Hefe abhängig ist. Wird die Hefe bei der Ernte nur etwas länger auf dem Membranfilter belassen, so nimmt der Anteil der Triphosphate zu Gunsten der Monophosphate ab (PFLÜGER).

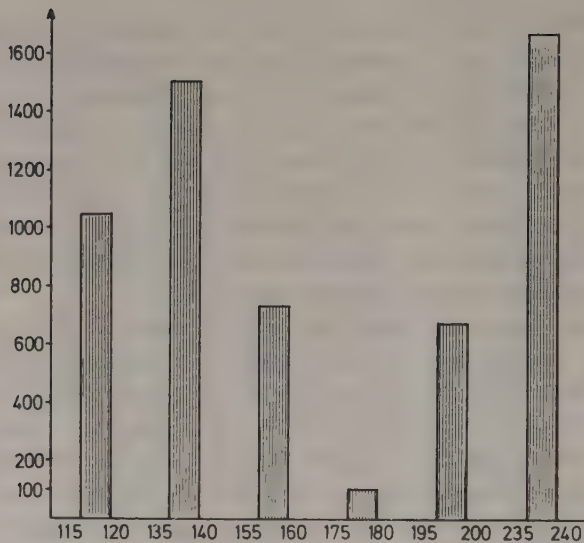


Abb. 15: Aufnahme von ^{14}C -Inosin von 150 ml Hefesuspension während einer 5-minütigen Kurzzeitmarkierung zu verschiedenen Zeiten im Zellzyklus.

5.2. Verhalten der Desoxyribonucleotide (Kurzzeitmarkierung)

Vor der Betrachtung des Desoxyribonucleotidpools soll kurz die Synthese der Desoxyribonucleotide skizziert werden. Ausführliche Untersuchungen sind von REICHARD et al. durchgeführt worden. Für die DNA-Bildung müssen die 4 Desoxyribonucleotide (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) kurz vor dem DNA-Synthesebeginn in ausreichender Konzentration und im optimalen Verhältnis zueinander vorliegen. Dazu müssen Ribonucleotidphosphate zu dem Desoxyribo-

nucleotiddiphosphaten durch das Ribonucleotid-Reduktase-System reduziert werden. Das Thioredoxin ist ein verhältnismäßig kleines Proteinmolekül und enthält eine Disulfidgruppe, in der Aminosäure Cystin. Diese Disulfidbrücke des Thioredoxins wird durch die Thioredoxin-Reduktase in Gegenwart von NADP^+ reduziert und wirkt dann selbst bei den Ribonucleotiddiphosphaten als reduzierendes Agens. Die Regulation dieses Reduktionssystems ist noch nicht endgültig geklärt. So soll bei *E. coli* (REICHARD), bei HeLa-Zellen (BRAY) und Novikoff-rat-hepatoma-Zellen dATP das Thioredoxin hemmen. Andererseits wird nach POWELL bei *Lactobacillus leichmannii* bei höheren dATP-Spiegeln eine Aktivitätssteigerung der Desoxyribonucleotidkinasen beobachtet und somit eine Vergrößerung des Desoxyribonucleotidtriphosphatpools. Für Hefe sind mir keine Untersuchungen in der Richtung bekannt.

Bei dem Desoxyribonucleotidgesamtpool (Abb. 16) von *Saccharomyces cerevisiae* fallen zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellteilungszyklus während einer 5-minütigen Kurzzeitmarkierung deutliche Unterschiede in der Markierungsintensität auf. Während der Einbau von ^{14}C -Inosin in den Desoxyribonucleotidpool zur 120. Minute noch gering ist, steigt er in der 140. Minute auf den 2,5-fachen Wert an. Mit Beginn der DNA-Synthese (~ 160 . Minute) erfolgt ein steiler Abfall, der wahrscheinlich nicht durch eine Verminderung der Desoxyribonucleotidsynthese hervorgerufen wird, sondern durch den zu der Zeit stattfindenden starken Einbau von Desoxyribonucleotiden in die DNA. Auch ECKSTEIN (1971) findet deutliche rhythmische Schwankungen im Desoxyribonucleotidpool im Verlauf des Zellzyklus und auch hier fällt die Desoxyribonucleotidkonzentration während der S-Phase stark ab.

Es besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen der Verminderung des Desoxy- und des Ribonucleotidpools. Während der Abfall im Ribonucleotidpool durch die schon beschriebenen Aufnahmeverminderung, Energiedrosselung und RNA-Synthese-Stop erklärt werden muß, erfolgt bei dem Desoxyribonucleotidpool eine sehr starke und ausschließliche Entnahme zur DNA-Synthese. Die cpm-Werte allein sagen leider nichts über die Syntheserate der Nucleotide aus, sondern zeigen lediglich die Poolgröße zu den verschiedenen Zeitpunkten an. Die spezifische Aktivität konnte nicht bestimmt werden, da die Menge der Desoxynucleotide so gering ist, daß sie optisch nicht erfaßt werden kann.

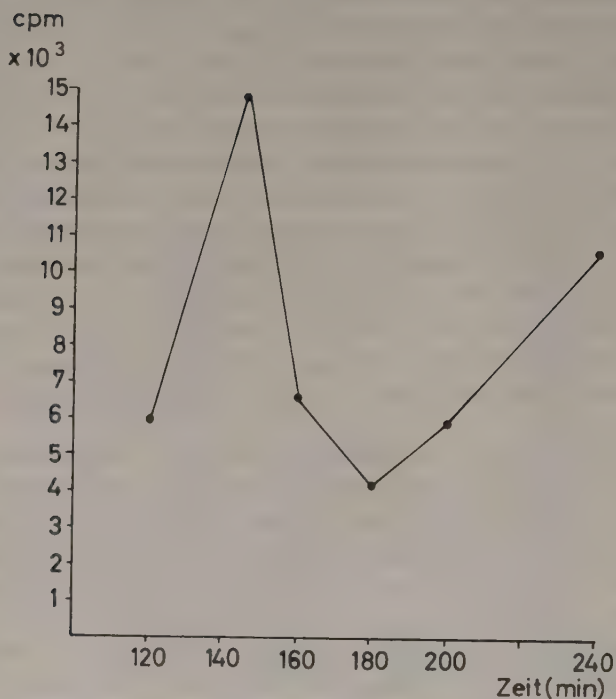


Abb. 16: 5 Min. Kurzzeitmarkierung des Desoxyribonucleotidpools im Verlauf des Zellzyklus.

Aus Abbildung 16 läßt sich schließen, daß die Thioreduktaseaktivität zwischen der 120. und 140. Minute stark ansteigt. LOWDON et al. konnten eine zyklische Änderung in der Thioreduktaseaktivität bei *Saccharomyces cerevisiae* zeigen. Sie finden bei hitze-synchronisierten Hefezellen den Aktivitätsgipfel direkt zu Beginn der DNA-Synthese. Dieser zeitliche Unterschied zwischen LOWDON und der obigen Abbildung läßt sich zum Teil sicher durch

die von LOWDON durchgeführte Hitzesynchronisation erklären. SCHERBAUM konnte zeigen, daß die Hitzesynchronisation tiefgreifende Änderungen in der Zelle hervorruft. Vergleicht man den Anteil der sprossenden Zellen in LOWDONs Population mit denen von SCOPES et al., die eine Synchronisation der Hefe durch Zentrifugation und fraktioniertes Wachstum erreichen, so wird eine "Verspätung" der Sprossenbildung im Vergleich zur DNA-Synthese bei LOWDON deutlich.

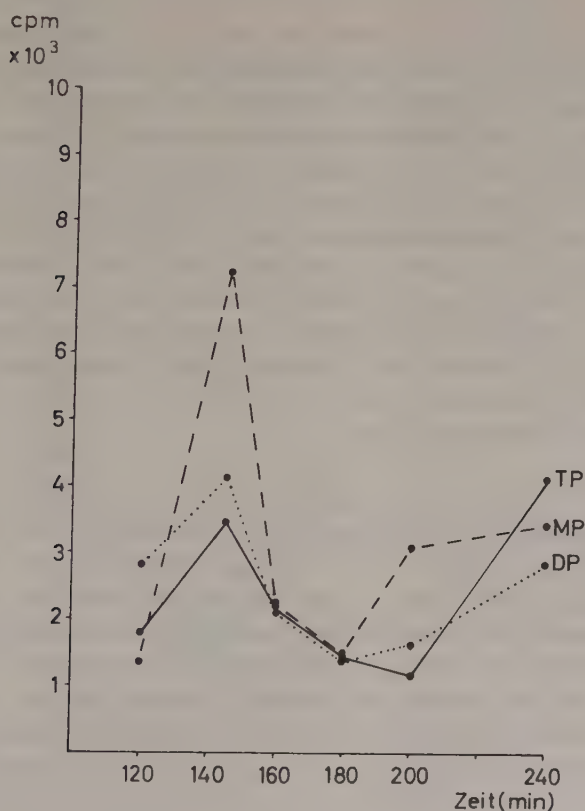


Abb. 17: Verhalten der Desoxy-, Mono-, Di- und Triphosphatpools bei einer Kurzzeitmarkierung.

Das Verhalten der Mono-, Di- und Triphosphatpools wird aus Abb. 17 ersichtlich. Alle drei Pools sind in der 140. Minute am stärksten markiert, und die Markierung steigt nach einem Minimum in der 240. Minute erneut an. Unter den hier beschriebenen Bedingungen beginnt die zweite S-Phase ungefähr zur 270. Minute. Obwohl die Synchronie der Hefepopulation dann schon wesentlich schlechter ist als vor der ersten Teilung, kann der Anstieg als Einleitung für die zweite Phase gedeutet werden.

Eine weitere Aufteilung der Peaks von Abb. 1 in die einzelnen Basen zeigt, daß der Anteil der Adenosinnucleotide größer ist als der der Guanosinnucleotide (Ausnahme 120. Minute bei den Triphosphaten, wo der GTP-Pool geringfügig größer ist als der ATP-Pool). Mit einer ^{14}C -Inosin-Markierung können nur die Veränderungen im Purinbasenpool beobachtet werden. Die zusätzliche Aufklärung des Pyrimidinbasenpools müßte mit markierter Orotsäure erfolgen. Die Konzentrationsverhältnisse der Pyrimidin-nucleotide im Verlauf des Zellzyklus wäre deshalb sehr interessant, weil von BRAY bei HeLa-Zellen dCTP als der größte Pool angegeben wird und KNUTSEN bei Chlamydomonas TTP als größte Menge findet. ECKSTEIN beschreibt für Hefe folgende Triphosphatpoolgrößen: $\text{dCTP} < \text{dGTP} < \text{dATP} < \text{dTTP}$.

Bildet man das Verhältnis von $\frac{\text{dATP}}{\text{dGTP}}$, so ist in der 120. Minute der Anteil der Desoxyribo-Guanosintriphosphate am Triphosphatpool geringfügig größer als der des Adenosintriphosphates. Das Verhältnis ändert sich aber in der 140. Minute deutlich zu Gunsten des Adenosintriphosphates, in der 160., 180. und 200. Minute sind die Schwankungen dieses Quotienten verhältnismäßig gering, während in der 240. Minute der ATP-Pool 4,8-mal stärker markiert ist als der GTP-Pool. Auch hier ist also ein deutlich rhythmisches Verhalten zu beobachten.

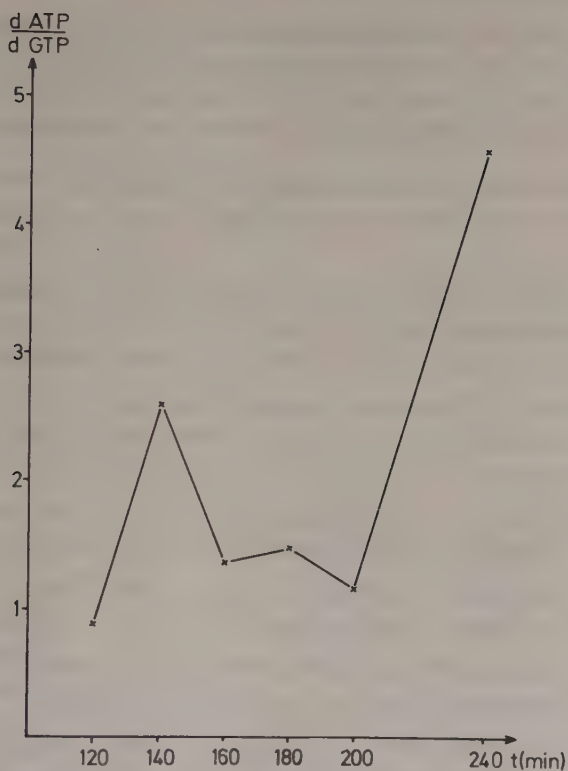


Abb. 18: Verhältnis $\frac{dATP}{dGTP}$ bei einer 5-minütigen Kurzzeitmarkierung im Verlauf des Zellzyklus.

Der größere ATP-Anteil vor Beginn der S-Phase weist darauf hin, daß bei der Hefe, wie auch von POWELL für *Lactobacillus leichmannii* beschrieben, dATP als Phosphatüberträger für die Thymidin-, die d-Guanosin- und die d-Cytidin-Kinase fungiert.

5.3. Der Peak I bei der Auftrennung der Desoxyribonucleotide über die PEI-Cellulose-Säule

Bei der Trennung der Desoxyribonucleotide über die PEI-Cellulose-Säule fällt nach Anschluß des Gradienten bei Fraktion 11 - 14 ein steiler Peak auf (s. Abb. 12). Zur Aufklärung dieser Fraktion wurden verschiedene Überlegungen und Versuche durchgeführt:

1. Die Substanz darf keine vicinalen Hydroxylgruppen besitzen, da sie mit den Desoxyribonucleotiden die Aminoboronsäuresäule verläßt.
2. Die Substanz muß eine ähnliche Molekülgröße und ähnliche Adsorptionseigenschaften an Biogel wie die untersuchten Nucleotide haben, da sie beim Entsalzen mit diesen isoliert wird.
3. Die Substanz muß eine sehr schwache Base sein, da sie schon bei einer Konzentration von 0,1 m NaCl von der PEI-Cellulose-Säule eluiert wird.
4. Die Konzentration der Substanz ist deutlichen rhythmischen Änderungen im Verlauf des Zellzyklus unterworfen (s. Abb. 19).
5. Bei einer Kurzzeitmarkierung (5 Minuten) mit ^{14}C -Inosin werden ungefähr 30 pmol/g Hefe markiert.
6. Fügt man kaltes cAMP als Marker hinzu, so erscheint die mit ^{14}C markierte Substanz genau an der Stelle des cAMP.

Auf Grund der Befunde 4. - 6. wurde vermutet, daß es sich bei dem Peak I um cAMP handeln könnte. Zur weiteren Aufklärung dieser Frage wurde ein Versuch mit Phosphodiesterase durchgeführt; die bekanntlich cAMP zu AMP umwandelt.

Nach der Trennung der Desoxyribonucleotide über die PEI-Cellulose Säule wurden die entsprechenden Fraktionen gepoolt und zum Entsalzen über die Biogelsäule gegeben. Nach dem Gefriertrocknen wurde mit 4 ml 0,1 m Triäthanolaminpuffer (pH 7.6) + 0,12 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,5 ml Phosphodiesterase 17 Stunden im Köttermann-Wasserbad bei 25°C geschüttelt (Boehringer Mannheim). Anschließend wird erneut auf die PEI-Cellulose-Säule aufgetragen und kaltes AMP als Marker zugefügt. Es zeigte sich, daß ein Teil der ^{14}C markierten Substanz an der Stelle von AMP erscheint. Es ist also anzunehmen, daß der Peak I jedenfalls teilweise von cAMP repräsentiert wird.

Substanz an der Stelle von AMP erscheint. Es ist also anzunehmen, daß der Peak I jedenfalls teilweise von cAMP repräsentiert wird.

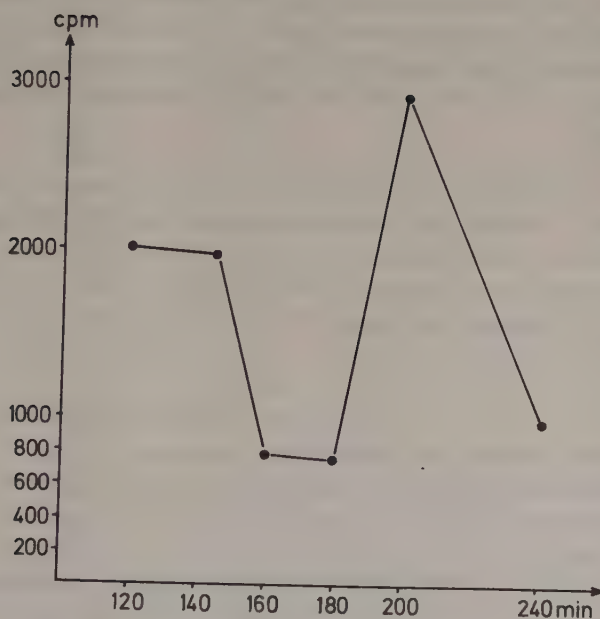


Abb. 19: Änderungen der ^{14}C -Markierungsintensität des Peak I bei einer 5-minütigen Kurzzeitmarkierung mit ^{14}C -Inosin.

5.4. Verhalten der Ribosen und Desoxyribosen bei Langzeitmarkierung

Die Versuche mit ^{14}C -Inosin Langzeitmarkierung sind vor allem durchgeführt worden, um die Wirkung von Cykloheximid auf den Nucleotidpool zu klären.

Im zweiten Teil der Arbeit ist schon beschrieben worden, daß bei Zugabe von Cykloheximid in der 145. Minute nach Versuchsbeginn die DNA-Synthese gehemmt wird. Es stellt sich nun die Frage, inwieweit Cykloheximid als Proteinsynthesehemmstoff auch die Bildung von Enzymen, die für die Nucleotidsynthese wichtig sind, hemmt.

Die Versuchsdurchführung entspricht der in "Allgemeine Durchführung der Trennung von Desoxyribonucleotiden und Ribonucleotiden" (Kap. 4) beschriebenen Anordnung C. Die Ernte der Hefe erfolgte in der 120., 140. und 195. Minute. In der 145. Minute wurde die Hefesuspension geteilt und der einen Hälfte $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ Cykloheximid zugefügt.

Bei der Auswertung der cpm-Werte der Langzeitmarkierung muß berücksichtigt werden, daß die Markierungsdauer mit den 3 angegebenen Zeitpunkten zunimmt. So wird nach 20-minütigem Einwirken von ^{14}C -Inosin (120. Minute) die Gesamtaktivität und die spezifische Aktivität kleiner sein als zur 140. und 195. Minute. Wenn trotzdem in der 140. Minute die gefundene ^{14}C -Aktivität kleiner ist als in der 120. Minute, so spricht das für einen Verbrauch an Gesamtnucleotiden.

5.5. Verhalten der Gesamtnucleotide

In der 195. Minute fällt deutlich auf, daß die Markierung in der mit Cykloheximid gehemmten Probe sehr viel größer als in der Kontrolle ist. Dieser Anstieg von Nucleotiden ist wohl zum größten Teil auf die gestoppte RNA-Synthese zurückzuführen. Daraus

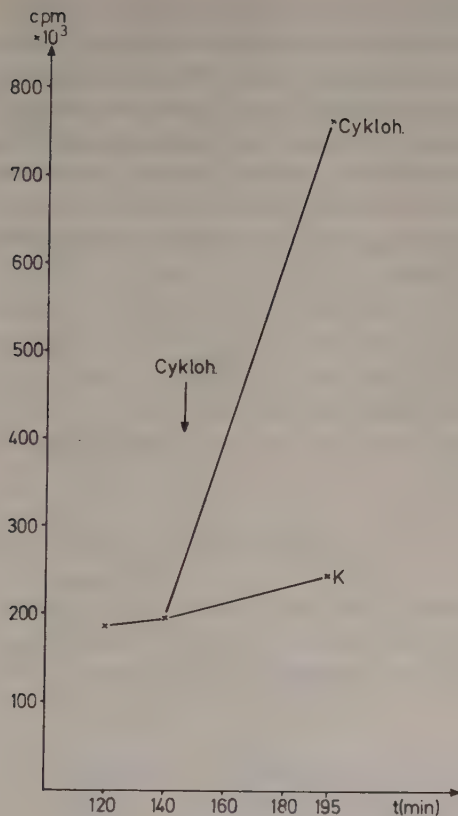


Abb. 20: Gesamtcounts der löslichen Nucleotide bei Langzeitmarkierung (^{14}C -Inosinzugabe in der 100. Minute) und Zugabe von 20 $\mu\text{g/ml}$ Cykloheximid in der 145. Minute.

ergibt sich, daß die von BENECKE beschriebenen, für die RNA-Synthese essentiellen kurzlebigen Enzyme eine kürzere Halbwertszeit haben müssen als die Enzyme, die an der Nucleotidsynthese beteiligt sind, da weiterhin Inosin zu Adenin und Guanin-nucleotiden umgewandelt wird.

Hier kommt aber ein weiterer wichtiger Punkt hinzu. Die durch

Cykloheximid gehemmten Zellen nehmen wesentlich mehr ^{14}C -Inosin aus dem Nährmedium auf als die Kontrollzellen. Schon oben wurde die unterschiedliche Entnahme von ^{14}C -Inosin bei der Kurzzeitmarkierung erwähnt (Abb. 15). Die Ergebnisse dieser Versuche lassen die Frage offen, ob die unterschiedliche ^{14}C -Markierung durch den geringeren Bedarf an Nucleotiden oder durch die verminderte Aufnahmerate bedingt ist. Bei den mit Cykloheximid gehemmten Proben besteht sicher kein Bedarf an Nucleotiden, da ja

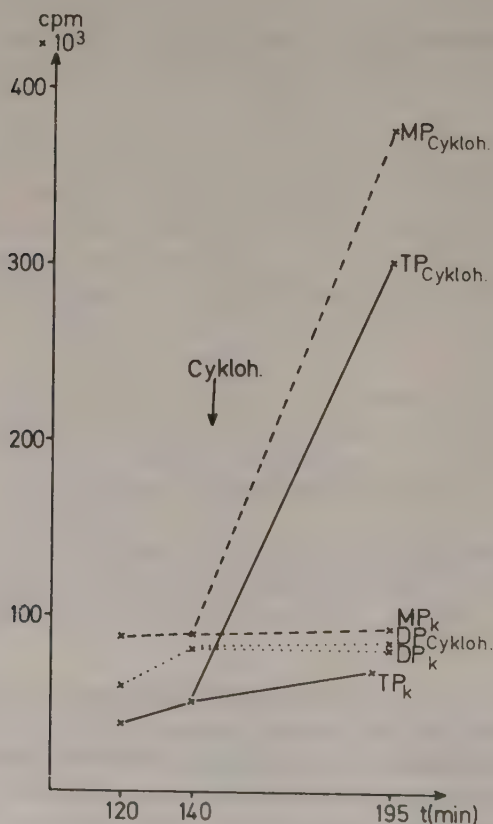


Abb. 21: Mono- (---), Di- (...) und Tri- (—) Phosphate der Gesamtnucleotide bei einer Langzeitmarkierung mit ^{14}C -Inosin (Zugabe in der 100. Minute) und 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cykloheximid in der 145. Minute.

weder RNA- noch DNA-Synthese stattfindet, trotzdem steigt die Aufnahmerate gegenüber der Kontrolle stark an, und der Gesamtnucleotidpool ist in der 195. Minute mehr als dreimal so stark markiert wie bei der Kontrolle. Für dieses Ergebnis sind entweder Zellwandveränderungen oder Änderungen der Aufnahmeregulation zu diskutieren.

Bei der Aufschlüsselung der Nucleotide nach der Phosphatoxylierungsstufe zeigt sich, daß vor allem die Markierung im Mono- und Triphosphatpool stark ansteigt, während sie sich im Diphosphatpool nach Hemmung mit Cykloheximid kaum ändert. Dieses Verhältnis läßt sich daraus erklären, daß die Triphosphate als Precursor für die RNA-Synthese zur Verfügung gestellt werden, ihre Polymerisation aber durch Cykloheximid gehemmt wird.

5.6. Verhalten der Desoxyribonucleotide

Wesentlich schwächer ausgeprägt sind die Veränderungen bei den Desoxyribonucleotiden. Auch hier ist zwar die Markierung der mit Cykloheximid gehemmten Probe stärker als die der Kontrolle, der Unterschied beträgt aber nur 13 %.

ECKSTEIN (1971) hemmt bei mit Röntgenstrahlen behandelten synchronisierten Hefezellen die Protein de novo-Synthese mit Cykloheximid und untersucht die Desoxyribosen mit Hilfe der Diphenylaminreaktion. Setzt er den Hemmstoff kurz vor Beginn der S-Phase seiner Hefekultur zu, so hat die gehemmte Probe 280 Minuten später scheinbar wesentlich weniger Desoxyribosen als die Kontrolle. Während dieser 280 Minuten hat mindestens eine Teilung in der Kontrolle stattgefunden, so daß hier bei gleichem Erntevolumen von 200 ml mindestens doppelt so viele Zellen extrahiert worden sind. Der Desoxyribosewert der Kontrolle muß also durch 2 dividiert werden. Die gehemmte Probe hat dann ~ 25 % mehr Desoxyribosen als die Kontrolle. Die ECKSTEINschen Ergebnisse stimmen also mit den hier vorgelegten überein.

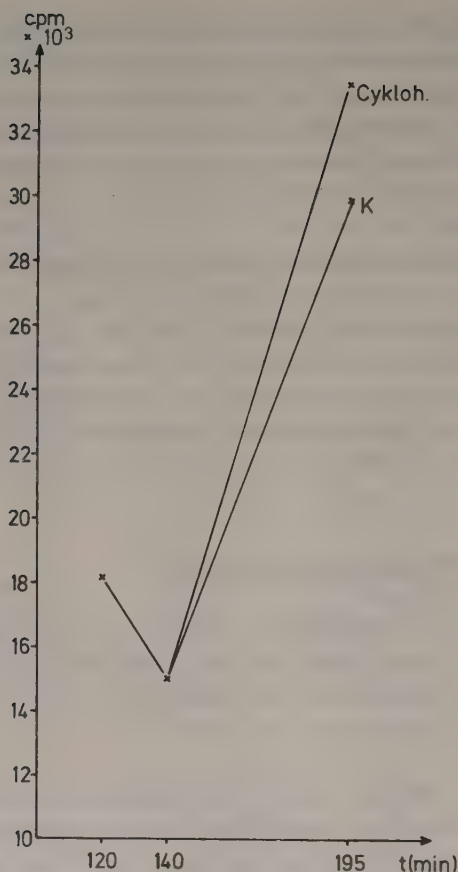


Abb. 22: Desoxyribonucleotide bei Langzeitmarkierung mit ^{14}C -Inosin und Zugabe von 20 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid.

Die Tatsache, daß es bei den Desoxyribonucleotiden nicht zu einem ähnlichen Anstau wie bei den Ribonucleotiden nach Zugabe von Cycloheximid kommt, ist wohl vor allem auf die Empfindlichkeit der Ribonucleotidreduktase gegenüber Cycloheximid zurückzuführen. LOWDON et al. beschreiben ausführliche Untersuchungen über die Hemmung der Ribonucleotidreduktase durch Cycloheximid. Schon 5 Minuten nach Zugabe des Hemmstoffes wird die de novo-Synthese des Enzyms gestoppt. Das Enzym hat anscheinend eine sehr

kurze Halbwertszeit, da es sofort auch zu einer Aktivitätsabnahme des Thioreduktasesystems kommt. Somit sollte also die Markierung des Desoxyribonucleotidpools der gehemmten Probe in der 195. Minute nicht wesentlich höher als in der 150. Minute sein, was auch der Fall ist.

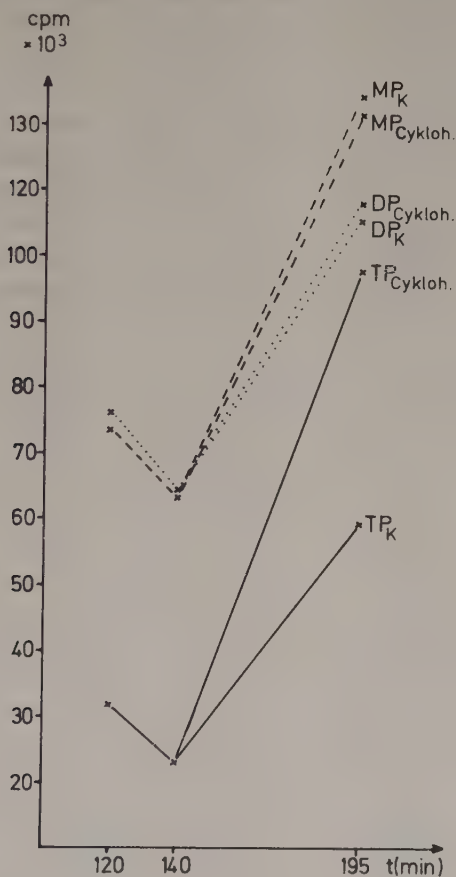


Abb. 23: Mono-(---), Di-(...) und Tri-(—) Phosphate der Desoxyribonucleotide nach Hemmung mit 20 μ g/ml Cycloheximid während einer Langzeitmarkierung mit ^{14}C -Inosin.

Im Mono- und Diphosphatpool sind praktisch überhaupt keine Unterschiede feststellbar, lediglich der Triphosphatpool der gehemmten Probe ist um nahezu 63 % stärker markiert als die Kontrolle. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß die DNA-precursor angestaut werden, da die Bildung der DNA-Polymerase, wie im zweiten Teil der Arbeit gezeigt, durch Cykloheximid gehemmt wird.

Synopsis der Ergebnisse

Es war das Ziel der hier durchgeführten Versuche zu prüfen, ob sich im Ablauf des Vermehrungszyklus von synchronisierter Hefe zwischen RNS- und DNS-Stoffwechsel einerseits zu den mit Perchlorsäure extrahierbaren Nucleotiden und Desoxynucleotiden andererseits qualitative und - wenn möglich - quantitative Beziehungen finden lassen. Dazu mußten erst einmal geeignete säulenchromatographische Trennungsmethoden ausgearbeitet werden, die in Teil 4 der Arbeit geschildert sind. Mit ihrer Hilfe konnte dann unter Verwendung von ^{14}C -Inosin als Precursor der Pool der säurelöslichen Nucleotide bei Kurz- und Langzeitmarkierung und bei Hemmung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid untersucht werden. Bei der hohen Stoffwechselgeschwindigkeit der Hefe ist es leider nicht möglich, die Kurzzeiteinwirkung so zu befristen, daß Aussagen über die momentane Synthese erhalten werden. Es sind auch bei den eingesetzten Hefemengen die Desoxynukleotidmengen zu klein, um optisch erfaßt werden zu können. Daten über spezifische Aktivitäten der Nucleotide konnten deswegen nicht gewonnen werden. Unter Zugrundelegen der gemessenen Aktivitäten als Maß für den Pool ergibt sich folgendes Bild:

Nach Untersuchungen vieler Autoren und nach eigenen Befunden kommt bei *Saccharomyces cerevisiae* die während des Wachstums zunächst logarithmisch verlaufende Bildung der RNA am Ende der G_1 -Phase für 20 bis 30 Minuten zum Stillstand, um kurz nach Beginn der S-Phase erneut anzusteigen. Die Versuche mit ^{14}C -Inosin ergaben nun, daß die Bildung des Plateaus bei der RNA ein Abfall der säurelöslichen Nucleotide, ebenfalls mit anschließendem Niveau und Wiederanstieg gegen Ende der S-Phase entspricht. Am phasischen Verlauf sind Tri-, Di- und Monophosphate in ziemlich gleichbleibendem Verhältnis zueinander beteiligt. Eine leichte Verschiebung von Tri- zu Monophosphat, die auf eine Drosselung des Energiestoffwechsels (SCOPES) hindeutet, wurde beobachtet. Als wesentlicher Faktor für Abfall und Niveau der säurelöslichen Nucleotide konnte eine Herabsetzung der Aufnahme des Precursors Inosin in die Zelle eruiert werden. Der vorübergehende Stillstand der RNA-Bildung kommt also größtenteils durch eine passagere Verminderung des Substratangebotes infolge Herabsetzung der Zellpermeabilität

zustande. Diese ist offenbar allgemeinerer Natur, da auch andere Substrate wie Glukose (GOLOMBECK) und O_2 -Aufnahme (SCOPES) davon betroffen sind. Es ist von besonderem Interesse, daß die Veränderung der Permeabilität bei Cycloheximid-Konzentrationen, welche die Proteinbiosynthese vollkommen hemmen, nicht auftreten. So kommt es zu einem Anstau von Nucleotiden. Das Phänomen der Permeationshemmung hängt also eng mit dem Einsetzen der S-Phase zusammen.

Einen eher noch eindeutigeren, zellzyklusabhängigen Verlauf weisen die Desoxyribonucleotide auf. Hier hebt sich die Bildung eines steilen Gipfels unmittelbar vor Beginn der S-Phase heraus, noch während die Ribonucleotide abfallen. Diesem Peak folgt ein Abfall unter die Ausgangskonzentration während der S-Phase selbst und an deren Ende ein Wiederanstieg. Hier hängt der Abfall offensichtlich mit der DNA-Synthese zusammen.

Bei der Aufschlüsselung der Desoxyribonucleotide in ihre 3 Phosphorylierungsstufen fallen erhebliche Unterschiede zu den Ribonucleotiden auf: 1. liegt ihr gegenseitiges Mengenverhältnis etwa um 1 : 1 : 1. Die d-Diphosphate zeigen im Verlauf der Zellphasen stärkere Schwankungen als die beiden anderen. Sie fallen 1,5 bis 2 mal mehr ab als die Triphosphate, erholen sich aber eher als diese. 2. ist der Status der Desoxyribonucleotide weitgehend unabhängig von Phosphorylierungsstatus der Ribonucleotide.

Wichtige Hinweise ergab die Auftrennung der Basenanteile vor Beginn der S-Phase. An ihm sind überwiegend die d-Adennucleotide - in geringerem Umfang die d-Inosinnucleotide - beteiligt, während die d-Guannucleotide sogar zurückgehen können. Das Gleiche wiederholt sich beim Ansatz zur zweiten S-Phase. Dieser rhythmische Ablauf wird besonders sinnfällig, wenn man den Quotienten dATP:dGTP bildet. Demnach könnte der d-Adenosintriphosphatspiegel für die Einleitung der S-Phase eine führende Rolle spielen. Man weiß nun, daß das Thioreduktasesystem durch d-Adenosintriphosphat gehemmt, die d-TP-Kinasen aber aktiviert werden. Über den d-Adenosintriphosphatspiegel könnten nun die beiden Enzymaktivitäten so reguliert werden, daß nach ausreichender Bereitstellung von d-Diphosphat das Angebot gebremst wird und damit die DNS-Synthese mittels der Kinasen geordnet ablaufen kann.

Zusammenfassung

1. Es wird eine säulenchromatographische Methode beschrieben, mit Hilfe von an Cellulose gebundener Aminoboronsäure Ribonucleotide und Desoxyribonucleotide quantitativ zu trennen und sie mit PEI-Cellulose nach ihrer Zusammensetzung zu analysieren. Das Verfahren ist für die Aufarbeitung von sauren Extrakten aus Hefe gut geeignet.
2. An synchronisierter Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wird durch Angebot von ^{14}C -Inosin der Ribo- und Desoxyribonucleotidpool bei Kurzzeit- und Langzeitmarkierung während Wachstum und Vermehrung sowie unter der Wirkung von Cycloheximid untersucht.
3. Ribo- und Desoxyribonucleotidpool zeigen rhythmische Veränderungen, die mit dem Zellzyklus in Zusammenhang zu bringen sind.
4. Der häufig beschriebene Stillstand der RNA-Synthese vor dem Einsetzen der S-Phase resultiert aus einer passageren Verminderung der Permeation von Substrat (^{14}C -Inosin) in die Zellen. Sie spiegelt sich in Absinken, Plateau und Wiederanstieg der säurelöslichen Nucleotide wieder.
5. Bei vermehrungshemmenden Cycloheximidkonzentrationen bleibt die Permeationshemmung aus. Die Nukleotide stauen sich intrazellulär an.
6. Die Desoxyribonucleotide bilden kurz vor Beginn der S-Phase einen steilen Peak, fallen während der DNA-Synthese ab und steigen vor der nächsten S-Phase wieder an. Am Abfall sind die d-Diphosphate besonders stark beteiligt.
7. An der Bildung des Peaks sind überwiegend d-Adenosinphosphate beteiligt. Daraus wird eine führende Rolle bei der Einleitung der S-Phase für sie abgeleitet.
8. Nach den Cycloheximidversuchen werden Thioreduktasen, TP- und d-TP-Kinasen als Kurzzeitenzyme bestätigt. Als Langzeitenzyme sind danach zu charakterisieren die DNA-Polymerase, die Nucleotidphosphorylasen und die Enzyme, welche Inosin zu Adenosin und Guanosin aufbauen.

Tabelle II: Mittelwerte der Versuche mit Kurzzeitmarkierung (5 Min.) mit ¹⁴C-Inosin im Verlauf des Zellzyklus von Hefe. Gesamtnucleotide (cpm-Werte)

Nucleotid	120. Min.	140. Min.	160. Min.	180. Min.	200. Min.	240. Min.
IMP	14808	9461	8837	16156	4498	3443
AMP	68616	58858	31079	44108	24965	48169
GMP	19304	15649	11165	18291	13257	9022
MP ges.	102728	83966	51081	78555	42220	60634
IDP	7445	2725	1754	--	703	--
ADP	31805	35138	18856	17359	22806	--
GDP	9773	8426	11070	13004	7798	--
DP ges.	49024	46289	31680	30363	31307	22929
ITP	3376	7526	--	--	--	5047
ATP	34366	34813	25283	11303	36668	68793
GTP	12879	18468	3324	1801	11163	5365
TP ges.	50621	60807	28607	13107	47826	79205
MP ges. +						
DP ges. +	202374	191066	111369	122025	121354	162769
TP ges.						

Tabelle III: Mittelwert der Versuche mit Kurzzeitmarkierung (5Min.) mit ^{14}C -Inosin im Verlauf des Zellzyklus von Hefe. D e s o x y n u c l e o t i d e (cpm-Werte)

Nucleotid	120. Min.	140. Min.	160. Min.	180. Min.	200. Min.	240. Min.
Peak I	2014	1907	787	765	2965	1063
IMP	224	295	205	276	526	829
AMP	757	5764	1494	756	1852	2106
GMP	401	1167	572	416	765	509
MP ges.	1350	7226	2217	1450	3143	3444
IDP	220	602	449	195	536	694
ADP	1320	2279	1196	1013	784	1635
GDP	1377	1224	473	214	316	544
DP ges.	2827	4105	2119	1422	1636	2857
ITP	276	649	76	233	359	993
ATP	691	2108	1269	705	482	2641
GTP	831	726	919	477	337	543
TP ges.	1798	3483	2264	1415	1178	4178
MP ges. +						
DP ges. +	5975	14813	6600	4272	5957	10618
TP ges.						

Tabelle IV: Mittelwerte der Versuche mit Langzeitmarkierung mit ^{14}C -Inosin im Verlauf des Zellzyklus von Hefe. Gesamtnucleotide (cpm-Werte)

Nucleotid	120. Min.	140. Min.	195. Min. Kontrolle	195. Min. gehemmte Probe
IMP	7416	11603	23867	10576
AMP	58169	62749	49581	339355
GMP	21763	13978	17938	27372
MP ges.	87383	88330	91386	377303
IDP	--	1011	1991	17276
ADP	--	52016	55917	52602
GDP	--	30564	23786	12905
DP ges.	60270	81569	81694	82783
ITP	4400	2722	4101	4513
ATP	31833	40909	55682	205343
GTP	3308	8126	8813	93807
TP ges.	39541	51757	68596	303663
MP ges. +				
DP ges. +	187195	194466	241676	763700
TP ges.				

Tabelle V: Mittelwerte der Versuche mit Langzeitmarkierung mit ^{14}C -Inosin im Verlauf des Zellzyklus von Hefe. Desoxy nucleotide (cpm-Werte).

Nucleotid	120. Minute	140. Minute	195. Minute Kontrolle	195. Minute gehemte Probe
Peak I	2552	1628	1900	2285
IMP	1794	1766	2186	1669
AMP	4182	3464	8263	9610
GMP	1379	1069	2990	1970
MP ges.	7355	6299	13439	13249
IDP	1140	710	1556	1361
ADP	5414	4233	7349	7230
GDP	1065	1509	1657	2270
DP ges.	7619	6452	10562	10865
ITP	644	--	805	2402
ATP	2104	1654	4303	6588
GTP	441	603	717	815
TP ges.	3189	2257	5825	9805
MP ges. +				
DP ges. +	18165	15008	29826	33919
TP ges.				

Literaturverzeichnis

- Barker, G.R.: Nucleic Acids, Advan. Carbohydrate Chem.
11, 285 (1956)
- Benecke, B.J., A. Ferencz and K.H. Seifart:
Resistance of Hepatic RNA Polymerase to Compounds
Effecting RNA and Protein Synthesis in vivo.
Febs Letters, 31,1, 53 (1973)
- Bennett, L.L., J.D. Smithers and C.T. Ward:
Inhibition of DNA Synthesis in Mammalia Cells by
Actidione. Biochim. Biophys. Acta 87, 60 (1964)
- Bishop, Ph.D. and J.N. Davidson:
Changes in Desoxyriboside, Desoxyribotide and
Nucleic Acid Content of Rabbit Appendix and
Thymes After X Irradiation. Vol. XXX No. 355
- Boeseken, J.: Über die Lagerung der Hydroxyl-Gruppen von Poly-
oxy-Verbindungen im Raum. Die Konfiguration der
gesättigten Glykole und der α - und β -Glykose.
Chem. Ber. 46, 2612 (1913)
- Braun, R., W. Schmid und K. Stossek:
Gewinnung synchron wachsender und sich vermehrender
Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*)
Z. Naturforsch. 30c, 245 (1975)
- Bray, G., T.P. Bent: Desoxyribonucleoside 5'-Triphosphate pool
fluctuations during the mammalian cell cyclus.
Biochem. Biophys. Acta, 269, 184 (1972)
- Bray, G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting
aqueous solutions in a liquid scintillation counter.
Anal. Biochem. 1, 279-285 (1960)
- Brünner, W.: Affinitätschromatographie 2
Kontakte 2/74, S. 3 - 13
- Burton, K.: A study of Conditions and Mechanism of Diphenyl-
amine Reaction for the Colorimetric Estimation of
Desoxyribonucleic Acid.
Biochem. J. 62, 315 (1956)
- Cleffmann, G., I. Fehrendt and W. Behrendt:
A rate of uptake of ^3H -Actinomycin during the cell
cycle of *Tetrahymena*.
Exptl. Cell Res. 87, 139 (1974)
- Christen, H.R.: Grundlagen der organischen Chemie.
Verlag Sauerländer-Diesterweg-Salle.

- Dische, Z.: Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktion.
Mikrochemie 8, 4 (1930)
- Dougherty, Th., Schepark, A.: Desalting of nucleic acid hydrolysates, nucleosides and bases by chromatography on poly-N-vinyl-pyrrolidone.
J. Chromatog. 40, 299 (1969)
- Eckstein, H.: Acid soluble desoxynucleotides and DNA synthesis in growing yeast after X-irradiation I. Diphenylamine positive material in synchronized and asynchronously growing Cells.
Z. Naturforsch. 26 b, 1266 (1971)
- Eckstein, H., S. Ahnefeld and K. Albiets-Loges: Synthesis of Desoxynucleoside Tri- and Monophosphates in Synchronized and Asynchronously Growing Cells.
Z. Naturforsch. 29c, 272 (1974)
- Foury, F. and A. Goffeau: Stimulation of Yeast RNA-Synthesis by Cycloheximide and 3'5'-Cyclic AMP.
Nature New Biology Vol. 245, 44 (1973)
- Fukuhara, H.: RNA Synthesis of Yeast in the Presence of Cycloheximide.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 18,2, 297 (1965)
- Fukuhara, H.: Protein Synthesis in No-Growing Yeast. The Respiratory Adaption System.
Biochim. biophys. Acta 134, 143 (1967)
- Fukuhara, H.: Proc. natn. Acad. Sci. USA 58, 1058 (1967)
- Golombek, J. and E. Wintersberger: Glucose uptake in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*.
Exptl. Cell Res. 86, 199 (1974)
- Golombek, J., W. Wolf and E. Wintersberger:
DNA Synthesis and DNA Polymerase Activity in Synchronized Yeast Cells.
Mol. gen. Genet. 132, 137 (1974)
- Gray, P.P. and P.L. Rogers:
Action of Chloramphenicol and Cycloheximide on *Saccharomyces Carlsbergensis*: Batch and Continuous Studies.
Aust. J. biol. Sci. 24, 487 (1971)
- Gericke, G.: Tumor-Chemotherapie und Zellzyklus
Deutsches Ärzteblatt 17, 1197 (1975)
- Haertel, R.: Untersuchungen über den Status von Nucleinsäurefraktionen bei Wachstum und Vermehrung von Hefezellen nach Trennung über die Methylalbumin-Kieselgur (MAK)-Säule. Med. Diss. Marburg (1971)

- Hoff-Jorgensen, E.: Biochem. J. 1, 400 (1951)
- Kerridge, D.: The Effect of Actidione and other Antifungal Agents on Nucleic Acid and Protein Synthesis in *Saccharomyces Carlsbergiensis*. J. Gen. Microbiol. 19, 497 (1958)
- Khym, J.X.: The Use of the Borate Complex. Methods in Enzymol. 12, 93 (1967)
- Knutsen, G., T. Lien and L. Shory: Desoxyribonucleoside triphosphate and DNA synthesis in synchronized cultures of *Chlamydomonas*. Exptl. Cell Res. 83, 442 (1973)
- Langbehn, J.: Der RNS-Stoffwechsel von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) unter Wachstums- und Vermehrungsbedingungen. Med. Diss. Marburg, 1972
- Larks, K.G.: in Molecular Genetics, Part I (J.W. Taylor, editor) New York, Academic Press, Inc. 1963, S. 153
- Latuasan, H.E. and Berends, W.: The Action Mechanism of Actidione. Rec. Trav. chim. 77, 416 (1958)
- Letsinger, R.L. and Hamilton, S.B.: Organoboron Compounds, Popcorn Polymers and Highly Cross-linked Vinyl Polymers Containing Boron. J. Amer. Chem. Soc. 81, 3009 (1959)
- Lowdon, M., E. Vitols: Ribonucleotide Reductase activity during the cell cyclus of *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Biochemistry and Biophysics 158, 177 (1973)
- de Lucia, P. and J. Cairns: Isolation of an *E. coli* Strain with a Mutation affecting. Nature 224, 1153 (1969)
- Mierau, J.: Die Wirkung enzyminduzierender Pharmaka auf Gehalt, Eigenschaften und Matrizenfunktion von Leberchromatin. Diss. Marburg, 1973
- Mejbaum, W.: Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen in Derivaten der Adenylsäure. Z. Phys. Chem. 258, 117 (1939)
- Mitchison, J. M.: The Biology of Cell-Cycle Cambridge University Press (1971)
- Moore, E. C., B. Hurlbert: Regulation of mammalian desoxyribonucleotide biosynthesis by nucleotides as activators and inhibitors. J. Biol. Chem. 241, 4802 (1966)

- Mounolou, J.-C.: The Properties and Composition of Yeast Nucleic Acids, aus: The Yeasts. Volume 2, edited by A.H. Rose and J.S. Harrison. Academic Press London and New York, 1971
- Muldoon, J.J., Evans T., Nygaard, O.F. and Evans H.: Control of DNA Replication by Protein Synthesis at Defiended Times During the S Period in Physarum Polycyphalum. Biochim. Biophys. Acta 247, 310 (1971)
- Neuhard, J.: Studies on the Acid Souble Nucleotide Pool in Thymine Requiring Mutants of Escherchia Coli During Thymine Starvation. Biochim. Biophys. Acta 129, 104 (1966)
- Pflüger, K.H.: Analytische Methoden zur Extraktion und Trennung der freien Nukleotide von Hefe und ihre Anwendung zur Charakterisierung von Veränderungen des Nukleotidpools bei Zellwachstum und Zellvermehrung. Diss. Marburg, Juli 1975
- Powell, J.W., J.T. Wacksman: Evidence of four Desoxynucleosid Kinase Activities in Extracts of Lactobacillus leichmannii. Applied Microbiology, June 1973, 869-872
- Prescott, D.M.: The growth-duplication cycle of the cell. Intern. Rev. Cytol. 255, 11 (1961)
- Reichard, P.: Chromatographic Separations of Cytosine Containing Compunds. Acta Chem. Scand. 12, 1208 (1958)
- Reichhard, P.: The Biosynthesis of Desoxyribonucleotides. European J. Biochem. 3, 259, (1968)
- Reichhard, P.: Control of Desoxyribonucleotide Synthesis in vitro and in vivo. 1972
- Richardson, D., Schildkraut, C.L., Aposhian, H.V. and Kornberg, A.: Enzymatic Synthesis of Desoxyribonucleic Acid. XIV Further Purification and Properties of Desoxyribonucleic Acid Polymerase of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 239, 222 (1964)
- Retel, J. and Planta, R.J.: The investigation of the Ribosomal RNA Sites in Yeast DNA by Hybridization Technique. Biochim. biophys. Acta 169, 416 (1968)
- Rosenberg, M. and Gilham, P.T.: The Isolation of 3'terminal polynucleotides from RNA molecules. Biochim. biophys. Acta 246, 337 (1971)

- Scherbaum, O.H.: Chemical Prerequisites for cell Division.
In Levine 139 (1963)
- Schmidt, M.: Anorganische Chemie I
Anorganische Chemie II
Hochschultaschenbücher, Bibliographisches Institut.
- Schweizer, E., Mac Kechnie, D. and Halverson H.O.:
The Redundancy of Ribosomal and Transfer RNA
Genes in *Saccharomyces cerevisiae*.
J. mol. Biol. 40, 261 (1969)
- Scopes, A.W. and Williamson, D.H.: The growth and oxygen uptake
of synchronously dividing cultures of *Saccharomyces cerevisiae*.
Exp. Cell Res. 35, 361 (1964)
- Smith, D. Schaller, H., Bonhoeffer, F.: DNA Synthesis in vitro.
Nature 226, 711 (1970)
- Sebastian, J., Bhargava, M.M., Halvorson, H.: Nuclear Desoxynucleic
Acid-Dependent Ribonucleic Acid Polymerases from
Saccharomyces cerevisiae.
J. of Bact. 114, 1, 1 (1973)
- Siegel, M.R., Sisler, H.D.: Inhibition of Protein Synthesis in
vitro by Cycloheximide.
Nature, 200, 675 (1963)
- Siegel, M.R., Sisler, H.D.: Site of Action of Cycloheximide in
Cells of *Saccharomyces Pastorius*.
I. Effect of the Antibiotic on Cellular Metabolism.
Biochim. biophys. Acta 87, 70 (1964)
- Siegel, M.R., Sisler, H.D.: Site of Action of Cycloheximide in
Cells of *Saccharomyces Pastorius*.
II. The Nature of Inhibition of Protein Synthesis
in a Cell-Free System.
Biochim. biophys. Acta 87, 83 (1964)
- Siegel, M.R., Sisler, H.D.: Site of Action of Cycloheximide in
Cells of *Saccharomyces Pastorius*.
III. Further Studies on the Mechanism of Action
and the Mechanism of Resistance in *Saccharomyces*
spezies
Biochim. biophys. Acta 103, 558 (1965)
- Solms, J. and H. Deuel: Ionenaustauscherharze mit Borsäuregruppen
Chimia 11, 311 (1957)
- Sprinzel, M., K.-H. Scheit, H. Strombach, F. von der Haar and
F. Cramer: In Vitro Incorporation of 2'-Desoxyadenosine
and 3'-Desoxyadenosine into Yeast tRNA^{Phe} Using tRNA
Nucleotidyl Transferase and Properties of tRNA^{Phe}-
C-C-C 2' dA and tRNA^{Phe}-C-C-C-3'dA.
Biochem. and Biophys. Res. Com. 51, 4, 881 (1973)

- Stephen, J., Haber, J. and Halverson, H.:
Relationship between Sporulation-Specific 20
Ribonucleic Acid and Ribosomal Ribonucleic Acid
Processing in *Saccharomyces cerevisiae*.
J. of Bact. 112, 2, 806 (1972)
- Swann, M.M.: The control of the cell division: a review.
727, 17 (1957)
- Tauro, P., Schweizer, E., Epstein, R. and Halverson, H.D.:
in: *The Cell Cycle*. Edited by Padilla G.M.,
Whiston G.L. and Cameron I.L.
New York and London: Academic Press 1966
- Tipon, R.S.: The chemistry of the Nucleic Acids
Advan. Carbohydrate Chem. 1, 193 (1945)
- Tsukada, Y., Sugimori, R., Imai, K. and Katagin, H.:
Action of Cycloheximide on *Zygosaccharomyces Soja*.
J. Bacteriol. 83, 70 (1962)
- Udem, St. A., Warner, J.: Ribosomal RNA Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Mol. Biol. 65, 227 (1972)
- Uziel, M., Cohn, W.: Column Desalting Procedures in the Recovery
of Oligonucleotides from Chromatographie Effluents.
Federation Proc. 24, 668 (1965)
- Uziel, M., Cohn, W.: Desalting of Nucleotides by Gel-Filtration
Biochim. Biophys. Acta, 103, 539 (1965)
- Vischer, E., Zamenhof, S. and Chargoff, E.:
*Microbiol Nucleic Acids: The Desoxyribose Nucleic
Acids of Avian Tubercle Bacilli and Yeast.*
J. biol. Chem. 177, 429 (1949)
- Weichselbaum, T.E.: *Amer. J. Clin. Path. (Techn. Sec.)* 10. 40
(1946)
- Weith, H.L., J.L. Wiebers and P.T. Gilham: Synthesis of Cellulose
Derivates Containing the Dihydroxyboryl Group and a
Study of their Capacity to Form Specific Complexus
with Sugars and Nucleic Acid Components.
Biochemistry, Vol. 9 No. 22 (1970)
- Wescott, E.W.: Thesis, University of Maryland, p. 27 (1962)
- Wettstein, F.O., H. Noll and P. Penmann: Effect of Cycloheximide
on Ribosomal Aggregates engaged in Protein Synthesis
in Vitro.
Biochim., Biophys. Acta 87, 527 (1964)
- Williamson, D.H., In "The Development and Inter-relationship of
Cell Organelles",
Symposium 24 of the Society of Experimental Biology,
London.

- Williamson, D.H. and A.W. Scopes: The Behavior of Nucleic Acids in Synchronously dividing Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*.
Exp. Cell Res. 20, 238 (1960)
- Williamson, D.H.: The Timing of Desoxaribonucleic Acid Synthesis in the Cell Cycle of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. biophys. biochem. Cytol. 25, 517 (1965)
- Williamson, D.H.: Replication of the Nuclear Genome in Yeast does not Require Commitant Protein Synthesis.
Biochim. Biophys. Res. Com. 52, 731 (1973)
- Wintersberger, U. and Wintersberger E.: Studies on Desoxyribonucleic Acid Polymerases from Yeast.
1. Partial Purification and Properties of two DNA Polymerases from Mitochondria-free Cell-Extracts.
Eur. J. Biochem. 13, 11 (1970)
- Wintersberger U. and Wintersberger E.: Studies on Desoxyribonucleic Acid Polymerases from Yeast.
2. Partial Purification and Characterisation of Mitochondrial DNA Polymerase from Wild Type and Respiration-Deficient Yeast Cells.
Eur. J. Biochem. 13, 20 (1970)
- Whiffen, A.J., Bokonas, J.N. and Emerson, R.L.: The Production of an Antifungal Antibiotic by *Streptomyces griseus*.
J. Bacteriol. 52, 610 (1946)
- Wortberg, W.: Trennung vermehrungsanregender Stoffe aus Hefeextrakten von *Saccharomyces cerevisiae*.
Med. Diss. Marburg (1968)
- Yu, F.L. and P. Feigelson: The Rapid Turnover of RNA Polymerase of Rat Liver Nucleolus, and of its Messenger RNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2833 (1972).

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Schmid für die Überlassung des Themas und die stets hilfreiche und freundliche Unterstützung bei der Ausführung der vorliegenden Arbeit danken.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. W. Kunz für die Übernahme des Correferates und bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, insbesondere bei Frau B. von Brincken, für ihre Mitarbeit und Hilfe.

L e b e n s l a u f

- 12.9.1947 geboren in Delmenhorst (Niedersachsen) als Tochter des Landwirtschaftsdirektors Dr. Werner Fehrendt und seiner Ehefrau, der landwirtschaftlichen Lehrerin Cäcilie Fehrendt, geborene Frahm.
- 1954 Einschulung in die Grundschule in Delmenhorst.
- 1958 Max-Planck-Gymnasium in Delmenhorst.
- 1958 Gymnasium in Westerstede.
- 1964 Neusprachliches Gymnasium, Herder-Schule, in Kassel.
- 4.11.1966 Reifeprüfung an der Herder-Schule in Kassel
- WS 1966 Beginn des Studiums der Chemie, Biologie und Erziehungswissenschaften an der Philipps-Universität Marburg.
- SS 1969 Studium an der Universität Erlangen.
- ab WS 1969/70 Fortsetzung des Studiums an der Universität Marburg.
- 15.4.-31.12.70 Studentischer Tutor für zoologische Vorlesungen.
- 22.6.1970 Staatsexamensprüfung im Fach Erziehungswissenschaften.
- 1.1.-30.9.71 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Zoologischen Institut, Abt. Tierphysiologie.
- 28.6.1971 Staatsexamen für das höhere Lehramt.
- 15.10.1971 Beginn des Studiums in Pharmazie
- 12.4.1973 Pharmazeutisches Staatsexamen.
- WS 1973/74 Beginn des Studiums der Humanbiologie.
- Seit 1.9.1973 Arbeit an der vorliegenden Dissertation. Gleichzeitig wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie.

Meine akademischen Lehrer waren:

Aurich, Aziz, Blochmann, Bock, Böhme, Braun, Buchholtz, Cleffmann, Dehnicke, Dimroth, Ebel, Eger, Försterling, Franke, Gallwitz, Geyer, Haake, Haberich, Hajos, Hartke, Haustein, Hellner, Hensel, Heubel, Heumann, Hildebrandt, Hilp, Hohenester, Ihm, Lenski, List, Ludwig, Lüdtke, Luther, Kamper, Karlson, Kating, Kellner, Kessel, Klafki, Koch, Koecke, Koransky, von Kraft, Kriegelstein, Kuhn, Kunz, Madelung, Mattes, Matusch, Merz, Nöth, Nultsch, Petry, Pfeil, Pollmann, Portig, Rohen, Schmid, Schmitz, Schneider, Scriba, Sekeris, Seidel, Seitz, Senger, Siess, Siewig, von Stosch, Unterhalt, Vogel, Walther, Wehrmeyer, Wesemann, Willhun, Witzel.

